



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA-CSIC
Instituto de Biología Funcional y Genómica

**Regulación del inicio de la recombinación
meiótica por actividad CDK en
*Schizosaccharomyces pombe***

Luisa F. Bustamante Jaramillo
2017



**Universidad de Salamanca-CSIC
Instituto de Biología Funcional y Genómica**

El **Dr. D. Francisco del Rey Iglesias**, Catedrático del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA:

Que la memoria titulada **“Regulación del inicio de la Recombinación Meiótica por Actividad CDK en *Schizosaccharomyces pombe*”** presentada por la Licenciada **Luisa F. Bustamante Jaramillo**, para optar al Grado de Doctora en Biología, ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Cristina Martín Castellanos en el Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG), centro mixto de la Universidad de Salamanca (USAL) y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expide el presente certificado en Salamanca, a 29 de Junio de 2017.

Fdo. Dr. D. Francisco del Rey Iglesias



**Universidad de Salamanca-CSIC
Instituto de Biología Funcional y Genómica**

La **Dra. Cristina Martín Castellanos**, Científico Titular del CSIC,

CERTIFICA:

Que la memoria titulada **“Regulación del inicio de la Recombinación Meiótica por Actividad CDK en *Schizosaccharomyces pombe*”** presentada por la Licenciada **Luisa F. Bustamante Jaramillo**, para optar al Grado de Doctora en Biología, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG), centro mixto de la Universidad de Salamanca (USAL) y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expide el presente certificado en Salamanca, a 29 de Junio de 2017.

Fdo. Dra. Cristina Martín Castellanos

El Dr. Cesar Roncero, Profesor Titular del Departamento de Microbiología y Genética, de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA:

Que la memoria titulada **“Regulación del inicio de la Recombinación Meiótica por Actividad CDK en *Schizosaccharomyces pombe*”** presentada por la Licenciada **Luisa F. Bustamante Jaramillo**, para optar al Grado de Doctora en Biología, ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Cristina Martín Castellanos en el Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG), centro mixto de la Universidad de Salamanca (USAL) y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expide el presente certificado en Salamanca, a 29 de Junio de 2017.

Fdo: Dr. Cesar Roncero.
Tutor

ABREVIATURAS

A ₅₉₅	Absorbancia a 595 nm
APC/C	<i>Anaphase Promoting Complex/ Cyclosome</i> , complejo promotor de la anafase/ciclosoma
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATR	<i>ATM and Rad3 Related</i>
ATP	Adenosin trifosfato
°C	Centígrado
CAK	<i>CDK Activating Kinase</i> , quinasa activadora de CDK
CKI	<i>CDK Inhibitor</i> , inhibidor de CDK
CO	Crossover
NCO	Non crossover
CDK	Kinasa dependiente de ciclina- <i>Cyclin Dependent Kinases</i>
DO	Densidad Optica
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
DEPC	agua tratada con dietilpirocarbonato
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
ADN	<u>Á</u> cido <u>D</u> esoxirribo <u>N</u> ucleico
DSB	Rotura de doble cadena - <i>Double Strand Break</i>
EDTA	Ácido etilen diamino tetra acético - <i>Ethylene Diamine TetraAcetic acid</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
HJ	Unión de Holliday - <i>Holliday junction</i>
HR	Recombinación Homóloga
HU	Hidroxiurea
Kb	Kilobase
LinEs	Elementos lineales - Linear elements
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar
M	Molar
Mb	Megabase
MBF	<i>Mlu1 Binding Factor</i>
<i>mbs1</i>	<i>Meiotic break site 1</i>
MCM	<i>Minichromosome maintenance</i>
mg	Miligramo
MI	Meiosis I o primera división meiótica
MII	Meiosis II o segunda división meiótica
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MM	Medio Mínimo
MMR	<i>Mis-Match Repair</i>
MRN	Complejo Mre11/Rad50/Nbs1
MRX	Complejo Mre11/Rad50/Xrs2
NER	<i>Nucleotide Excision Repair</i>
ng	nanogramo
nm	nanometro
nt	nucleótido
ORF	Marco abierto de lectura - <i>Open reading frame</i>
pb	Pares de bases

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa - <i>Polymerase chain reaction</i>
PEG	Polietilenglicol
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico - <i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDSA	<u>S</u> <i>ynthesis</i> - <u>D</u> <i>ependent</i> <u>S</u> <i>trand</i> <u>A</u> <i>annealing</i>
SPB	<i>Spindle Pole Body</i> , cuerpo polar del huso
U	Unidades
UV	Ultravioleta
V	Voltios
WT	Cepa silvestre - <i>Wild type</i>
YES	Medio rico - <i>Yeast extract supplemented</i>

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Ciclo de vida	3
2. Meiosis:	4
2.1 Requerimientos para la entrada en meiosis	7
2.2 Programa de expresión génica	8
2.3 Características de la meiosis: Tipo de división especial	10
2.3.1 Inicio de la recombinación meiótica	14
2.3.2 Procesamiento de los DSBs	15
2.3.3 La recombinación meiótica en otras especies. Conservación funcional	19
3. Coordinación de la progresión por fase S y la recombinación:	19
3.1 Coordinación por el <i>checkpoint</i> de fase S	19
3.2 Coordinación por las quinasas de ciclo	22
4. Actividad CDK durante meiosis	23
 OBJETIVOS	 29
 RESULTADOS	 33
1. Actividad CDK en la progresión por meiosis	35
1.1 Progresión por meiosis de los mutantes de delección de las ciclinas	36
1.1.1 El mutante de delección de <i>cig1</i> no presenta fenotipo en la progresión por meiosis, aunque en ausencia de Cig2 esta ciclina contribuye a la progresión por fase S	37
1.1.2 El mutante de delección de <i>crs1</i> no presenta fenotipo en la progresión por meiosis, aunque en ausencia de Cig2 esta ciclina contribuye fuertemente a la progresión por fase S	39
2. Actividad CDK en el inicio de la recombinación meiótica	43
2.1 Antecedentes	43
2.1.1 Ensayos de recombinación	44
2.1.2 Fenotipos de recombinación de los mutantes de delección de las ciclinas de G1/S recogidos en la Tesina	45
2.1.3 Fenotipos de recombinación del mutante de delección (completa) de la ciclina <i>crs1</i>	46
2.2 Formación de DSBs en mutantes de falta de función de actividad CDK	49
2.2.1 Los mutantes de delección de las ciclinas de G1/S tienen reducidos los niveles de DSBs	50
2.2.2 El mutante de delección de <i>crs1</i> , ciclina meiótica, es defectivo en la formación de DSBs y presenta un fenotipo aditivo con el mutante de delección de <i>cig1</i>	52
2.2.3 El mutante de delección de <i>crs1</i> , ciclina meiótica, es defectivo en la formación de DSBs en ausencia de reparación (mutante <i>rad50S</i>)	54
2.2.4 La inhibición de la actividad global de CDK (<i>cdc2-asM17</i>) reduce drásticamente la formación de DSBs	55
2.3 Posibles puntos de regulación por actividad CDK	58
2.3.1 Estudio de los LinEs utilizando como herramienta la proteína Rec25-GFP	58
2.3.1.1 Análisis de la localización de Rec25-GFP en el doble mutante	60

de delección <i>cig1 crs1</i>	
2.3.1.2 Análisis de la localización de Rec25-GFP tras la inhibición global de la actividad CDK (mutante <i>cdc2-asM17</i>)	63
2.3.1.3 Análisis de la unión a la cromatina de Rec25-GFP en el doble mutante <i>cig1 crs1</i>	68
2.3.1.4 Análisis de la unión a la cromatina de Rec25-GFP tras la inhibición global de la actividad CDK (mutante <i>cdc2-asM17</i>)	70
2.3.2 Estudio del complejo de pre-recombinación SFT utilizando como herramienta la proteína Rec24-GFP	71
2.3.2.1 Análisis de la unión a la cromatina de Rec24-GFP tras la inhibición global de la actividad CDK (mutante <i>cdc2-asM17</i>)	72
2.3.3 Posible papel en la regulación transcripcional de genes que codifican proteínas del inicio de la recombinación	73
2.3.3.1 Análisis de la expresión de <i>mde2</i> en el doble mutante de delección <i>cig1 crs1</i>	75
2.3.3.2 Análisis de la expresión de <i>mde2</i> tras la inhibición global de la actividad CDK (mutante <i>cdc2-asM17</i>)	77
2.4 Búsqueda de dianas de CDK	79
2.4.1 Construcción de fosfo-mutantes de Rec7. Características	80
2.4.2 Fenotipos de recombinación de fosfo-mutantes de Rec7	82
2.4.3 Formación de DSBs en los fosfo-mutantes de Rec7	84
3. Caracterización de la ciclina meiótica Crs1	87
3.1 Antecedentes	87
3.2 La proteína de fusión Crs1-GFP es funcional	90
3.2.1 La cepa portadora de la proteína de fusión Crs1-GFP no presenta fenotipo en recombinación meiótica	90
3.2.2 La cepa portadora de la proteína de fusión Crs1-GFP no tiene alterada la progresión por meiosis	90
3.3 Crs1 presenta niveles de expresión altos durante la profase meiótica	92
3.4 Crs1 presenta una localización pan-nuclear durante la profase meiótica y una localización en el SPB desde el inicio de la meiosis	92
DISCUSIÓN	103
1. <i>Cig1</i> y <i>Crs1</i> contribuyen a la progresión por fase S en ausencia de <i>Cig2</i>	105
2. La actividad CDK se requiere para la recombinación	110
2.1 Las ciclinas de G1/S contribuyen a mantener niveles normales de DSBs y de recombinación	111
2.2 La ciclina específica de meiosis <i>Crs1</i> es necesaria para la formación de DSBs y la recombinación	114
2.3 El mutante $\Delta cig1 \Delta crs1$ presenta fenotipo aditivo en la formación de DSBs pero no en ensayos de recombinación	116
2.4 La actividad CDK global se requiere para la formación de DSBs	117
3. Impacto de la falta de actividad CDK en el inicio de la recombinación	118
4. Mutaciones en sitios consenso para CDK en la proteína Rec7 no afectan a la recombinación	121
5. La expresión y localización de la ciclina <i>Crs1</i> es incompatible con un papel en profase meiótica	123
CONCLUSIONES	127

MATERIALES Y MÉTODOS	131
1. Cepas utilizadas	133
2. Medios y condiciones de cultivo	137
3. Inducción de meiosis	137
3.1 Inducción de meiosis zigóticas en la cepa homotática h ⁹⁰	137
3.2 Inducción de meiosis sincrónicas azigóticas en diploides <i>pat1-114</i>	138
4. Citometría de flujo	138
5. Construcción de cepas	139
5.1 Construcción del mutante de delección $\Delta crs1$	139
5.2 Construcción de la proteína de fusión Crs1-GFP	140
5.3 Construcción de fosfo-mutantes de la proteína Rec7	142
5.4 Construcción de cepas mediante cruces genéticos	144
5.5 Construcción de cepas diploides en el fondo mutante <i>pat1-114</i> : Fusión de protoplastos	145
6. Análisis de ácidos nucleicos	146
6.1 Amplificación de DNA: reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	146
6.2 Secuenciación del DNA	148
6.3 Procesamiento de fragmentos de DNA: Separación de fragmentos de DNA en geles de agarosa	148
6.4 Geles de campo pulsante	148
6.4.1 Recogida y procesamiento de muestras	148
6.4.2 Visualización de DSBs en cromosomas enteros	149
6.4.3 Detección de DSBs en el <i>hotspot mbs1</i> por digestión con la enzima de restricción Not1 (Fragmento J)	150
6.4.3.1 Transferencia de ácidos nucleicos a membranas de Nylon	150
6.4.3.2 Marcaje de moléculas de DNA con radioisótopos	151
6.4.3.3 <i>Southern blot</i> : Pre-hibridación, hibridación y exposición	152
6.4.3.4 Cuantificación de la señal en el <i>hotspot mbs1</i>	152
6.5 Extracción de RNA y <i>Northern blot</i>	153
6.5.1 Extracción de RNA	153
6.5.2 <i>Northern blot</i> : Pre-hibridación e hibridación	153
6.5.3 Cuantificación de la señal de la expresión de los genes <i>mde2</i> y <i>mei4</i>	154
7. Análisis de proteínas	155
7.1 Extractos proteicos con TCA	155
7.2 Fraccionamiento de cromatina	155
7.3 Separación en geles de acrilamida	157
7.4 <i>Western blot</i> e inmunodetección en membranas de nitrocelulosa	157
8. Microscopía óptica	158
8.1 Tinción de núcleos con DAPI: Seguimiento de la meiosis sincrónica	158
8.2 Fijación Metanol/Acetona	158
8.3 Visualización de proteínas etiquetadas con GFP	159
8.4 Cuantificación de la señal de las proteínas etiquetadas con GFP	159
9. Ensayos de recombinación	160
10. Presentación de datos	163
BIBLIOGRAFÍA	165



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Schizosaccharomyces pombe es un organismo modelo gracias a lo fácil que resulta su manejo en el laboratorio para abordajes genéticos y moleculares (Hoffman et al., 2015). Las células de esta levadura tienen forma cilíndrica, de unos 3-4 μm de diámetro y 12-15 μm de longitud; crecen por los extremos manteniendo un diámetro constante y se dividen por fisión formando un tabique o septo transversal en el medio de la célula. Tienen un genoma de tamaño similar al de la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae* (13,8 Mb), distribuido en tres cromosomas (5,7, 4,6 y 3,5 Mb).

1. Ciclo de vida de *Schizosaccharomyces pombe*

El ciclo de vida tiene una fase mayoritariamente haploide en la que se divide asexualmente siempre y cuando las condiciones del medio sean adecuadas. Si hay ausencia de nutrientes, principalmente de nitrógeno, las células se paran en G1 y salen del ciclo. Si las condiciones persisten, células de diferente sexo (h^+/h^-) conjugan para dar lugar a un cigoto. Si en ese estadio las condiciones de nutrientes se recuperan, el cigoto comienza un nuevo ciclo como diploide. Tanto los cigotos como las células diploides en ausencia de nitrógeno activan el programa meiótico para formar ascas con 4 ascosporas (Figura 1).

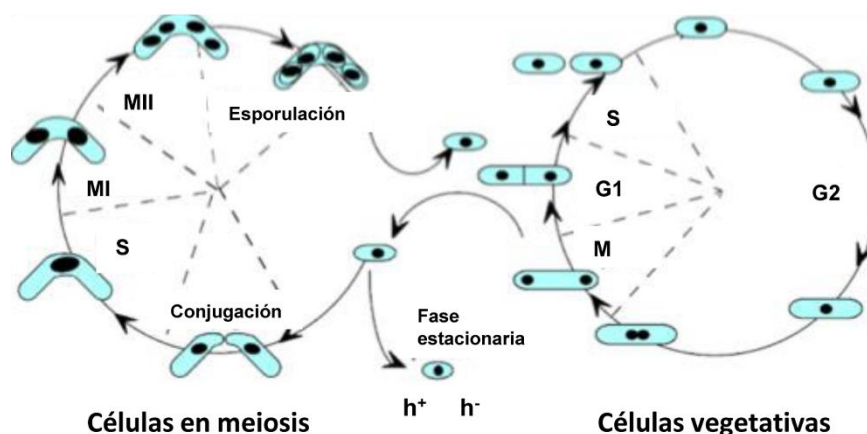


Figura 1. Ciclo celular de *S. pombe*: presenta una fase mayoritariamente haploide (derecha), la fase diploide es inestable y sólo se consigue mantener de forma artificial en el laboratorio. Ante condiciones nutricionales adversas, las células haploides de sexo contrario conjugan, forman un diploide transitorio (cigoto) que entra en meiosis y esporula formando cuatro esporas (izquierda). Esquema tomado del laboratorio de la Dra. Forsburg <http://www-bcf.usc.edu/~forsburg/index.html>.

2. Meiosis

2.1 Requerimientos para la entrada en meiosis

La meiosis es un proceso conservado en organismos con reproducción sexual que en sentido estricto podría considerarse un proceso de diferenciación, que se activa en órganos especializados o en determinadas condiciones ambientales para dar lugar a gametos en los organismos superiores y a estructuras de resistencia en levaduras y otros hongos. Es esencial para la reproducción sexual ya que reduce la ploidía celular previamente a la unión de las células sexuales, genera diversidad genética y está asociada intrínsecamente a un programa de expresión génica que hace posible la separación espacio-temporal de los procesos celulares y/o meióticos.

En levaduras, un factor determinante para la entrada en meiosis es la ausencia de nutrientes en el medio que hace que las células vegetativas activen diferentes rutas de señalización e inicien la meiosis con el fin de formar estructuras de resistencia para soportar las condiciones adversas.

En *S. pombe*, la falta de nutrientes, como es la ausencia de fuente de carbono, disminuye los niveles de AMPc y con ello favorece la inactivación de la ruta PKA (proteína quinasa A) que mantenía inhibido a Ste11, el factor de transcripción necesario para iniciar el programa de transcripción que desencadenará la entrada en meiosis. Este control se ejerce a través de la fosforilación y exclusión nuclear de Rst2, un activador transcripcional de *ste11* (Yamamoto, 2010; Higuchi et al., 2002; Kunitomo et al., 2000).

La ausencia de nitrógeno también produce la inducción de *ste11*, en este caso mediante la activación de la ruta TORC1 (*target of rapamycin*) (Weisman, 2016; Yamamoto, 2010; Weisman, 2010; Otsubo y Yamamoto, 2008). La activación completa de *ste11* necesita además la señalización de dos rutas de MAPK quinasa: la ruta de respuesta a stress (Wis4/Wak1 y Win1, Sty1/Spc1) (Yamamoto, 2010; Shiozaki y Russell, 1996; Kanoh et al., 1996; Takeda et al., 1995), y la ruta de señalización por feromonas (Byr2, Byr1, Spk1) (Yamamoto, 2010; Kjaerulff et al., 2005). Por último, la localización de la proteína Ste11 también está regulada nutricionalmente y la ausencia de nitrógeno induce su localización nuclear por AMPK (AMP quinasa, quinasa activada por AMP) (Valbuena y Moreno, 2012).

La expresión de Ste11 debe estar muy controlada en ciclo vegetativo. De hecho, Ste11 es fosforilado por CDK (quinasa dependiente de ciclina) para mantenerlo inactivo durante la mayor parte del ciclo celular, hasta que en G1 esta situación cambia debido a la caída de actividad CDK (Kjaerulff et al., 2007). Esta regulación tan compleja permite que la activación completa de Ste11 sólo se produzca en situaciones de falta de nutrientes, presencia de células de sexo contrario, y bloqueos en la progresión por ciclo (G1).

Ste11 se une a secuencias TR (T-rich box: TTTCTGTT) a través de su dominio HMG-box (*high movility group*), presente en los promotores de los genes que regula, entre los que se encuentran genes del *mating type* (*mat1-P* y *mat1-M*), el propio *ste11* y *mei2*, que codifica el regulador master de la entrada en meiosis (Sugimoto et al., 1991).

La quinasa Pat1 juega un papel clave en la inducción de la entrada en meiosis en células que están creciendo vegetativamente (McLeod y Beach, 1986; Iino y Yamamoto, 1985). Por un lado, fosforila e inactiva a Mei2 (Sato et al., 2002; Kitamura et al., 2001; Watanabe et al., 1997) y por otro fosforila e inactiva a Ste11 (Kitamura et al., 2001; Li y McLeod, 1996). Por tanto, la célula debe desactivar Pat1 para iniciar el programa meiótico. Esto va a ocurrir sólo en células heterocigotas para el *cassette* del *matyng type* (*mat1-P/mat1-M*), es decir, en células diploides tras la conjugación. La expresión conjunta de genes del *cassette mat1-P* (aportado por un parental) y del *cassette mat1-M* (aportado por el otro parental) inducirá la transcripción de *mei3*, que codifica un pseudosustrato de la quinasa Pat1 (Van Heeckenen et al., 1998; Li y McLeod, 1996; Willer et al., 1995; McLeod y Beach, 1988) (Figura 2).

Una vez se ha de-reprimido el programa meiótico, la proteína Mei2 secuestra a Mmi1, una proteína de unión a RNA perteneciente a la familia YTH que se une a transcritos específicos de meiosis que contienen la secuencia DSR (*determinant of selective removal*). Mmi1 se une a estas secuencias y marca a los RNAs mensajeros para su degradación por el exosoma, evitando así su acumulación y toxicidad en ciclo vegetativo (Yamashita et al., 2012; Yamanaka et al., 2010; St-Andre et al., 2010; Harigaya et al., 2006) (Figura 2). El llamado “regulón de Mmi1” contiene 31 genes de expresión meiótica entre los que se encuentran cohesinas (*rec8* y *rec11*), determinantes de *hotspots* de recombinación (*rec25* y *rec27*), y el factor de transcripción regulador de genes meióticos medianos *mei4* (Chen et al., 2011).

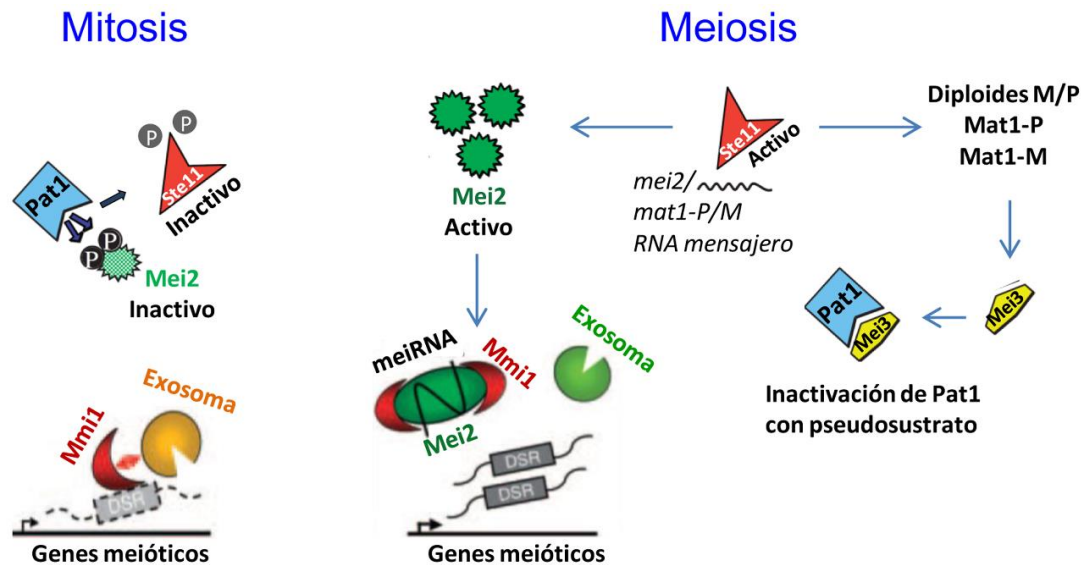


Figura 2: Entrada en meiosis. Durante mitosis la quinasa Pat1 ejerce una regulación negativa sobre el factor de transcripción Ste11 y la proteína meiótica Mei2. Mei2 fosforilado (inactivo) no puede secuestrar a Mmi1, que es una proteína que se une a las secuencias DSR (*determinant of selective removal*) de los RNA mensajeros de genes meióticos, y los marca para su degradación por el Exosoma. La falta de nutrientes induce la transcripción del factor de transcripción *ste11*; además, tras la conjugación, ambos *cassettes* del *mayting type* (*mat1-P/mat1-M*, cada uno de parentales de sexo opuesto) están presentes e inducen la expresión de *mei3*, que codifica un pseudosustrato de Pat1. Mei3 se une a Pat1 y elimina la regulación negativa sobre Ste11 y Mei2. Mei2 secuestra a Mmi1 e impide que se una a los RNA mensajeros, quedando libres de degradación. Adaptado de Yamamoto, 2010.

Existen otros mecanismos para salvaguardar la integridad de la célula evitando la toxicidad de la expresión de genes meióticos en ciclo mitótico. Así, la formación de islas de heterocromatina facultativa por metilación de la lisina 9 de la histona H3, se asocia a genes meióticos tempranos durante crecimiento vegetativo y desaparece rápidamente en ausencia de nitrógeno gracias al factor anti-silenciamiento Epe1 (Zofall et al., 2012).

Además, en ciclo vegetativo muchos genes meióticos, especialmente los medianos, presentan una transcripción anti-sentido mucho más abundante que la transcripción sentido. Sin embargo, en los casos analizados, se ha visto que introduciendo una parada transcripcional en el RNA anti-sentido, aunque se aumenta la transcripción del RNA sentido en ciclo vegetativo, no se llegan a alcanzar los niveles a los que llega en su inducción natural en meiosis; por lo que se cree que esta regulación sería un mecanismo que eliminaría la transcripción basal pero no sería suficiente para inducir la correcta expresión meiótica, que seguiría dependiendo de su factor de transcripción regulador, Mei4 (Chen et al., 2012).

Por último, algunos genes meióticos tempranos también son reprimidos transcripcionalmente por Fkh2 en ciclo vegetativo (Chen et al., 2012).

2.2 Programa de expresión génica

Como se comentó al principio, la meiosis está asociada a un programa de expresión génica que en *S. pombe* supone un aumento transcripcional de cuatro veces en el 20 % de sus genes (1033/5118 totales). Estos genes se agrupan en cuatro oleadas definidas por la temporalidad en la que se producen, cada una de ellas reguladas por factores de transcripción master ([Mata et al., 2007](#); [Mata et al., 2002](#)). Así tenemos:

- 250 genes relacionados con la señalización nutricional, la señalización por feromonas y entrada en meiosis, cuyo factor de transcripción master es Ste11. Este grupo incluye genes como *mat1*, *mei2* y *pat1*.

- 100 genes tempranos, necesarios para la replicación pre-meiótica del DNA (*cdc18*, *cig2*), la recombinación (*rec12*, *dmc1*) o la cohesión (*rec8*, *rec11*). Muchos de estos genes presentan cajas MluI y por tanto su regulación se atribuye a un complejo transcripcional denominado MBF (*MluI binding factor*) formado por Cdc10, Res2 y Rep1. De hecho, un 47 % de estos genes no se inducen correctamente en células sin Rep1 ([Mata et al., 2007](#)).

- 561 genes medianos que se inducen durante las divisiones meióticas e incluyen genes que codifican reguladores del ciclo celular (*cdc25* y *cdc13*), condensinas (*cnd1*, *cnd2*), kinesinas (*k1p5*, *k1p6*), componentes del SPB (*sad1*, *cut12*), componentes (*apc1*, *apc5*) y activadores (*sep1*) de APC, y reguladores de meiosis II (*mes1*, *spo6*). Más del 50 % de los genes medianos incluyen cajas FLEX en sus promotores, reconocidas por el factor de transcripción de la familia Forkhead, Mei4 ([Abe y Shimoda, 2000](#)). De hecho, la inducción de casi todos estos genes medianos está fuertemente reducida en ausencia de Mei4 ([Mata et al., 2007](#)).

Fkh2 es otro miembro de la familia Forkhead que regula la transcripción de genes mitóticos sobre todo en la fase G2, actuando como represor ([Papadopoulou et al., 2008](#)). Recientemente se ha visto que en meiosis facilita la transcripción de genes meióticos haciendo que la cromatina sea más accesible a Mei4 gracias a su unión previa al DNA, abriendo así una ventana de oportunidad para que Mei4 se una a una cromatina abierta. La actividad CDK asociada a la ciclina de G1/S Cig2 fosforilaría a Fkh2 para disminuir su afinidad por la cromatina y que Mei4, con mayor afinidad, pueda desplazarlo ([Alves-Rodrigues et al., 2016](#)).

-133 genes tardíos, implicados en la formación de las esporas y reguladores negativos del ciclo celular como *wee1*, *rum1* y *ste9*. Los promotores de estos genes presentan sitios de unión para los factores de transcripción Atf21 y Atf31; y el 55 % de ellos no se inducen correctamente en ausencia de Atf21 o Atf31 (Mata et al., 2002). Además, un grupo de estos genes tardíos está regulado por el factor de transcripción Rsv2 (Mata et al., 2007).

Estas oleadas están coordinadas entre sí, siendo un factor de transcripción master de una oleada temprana quien induce la transcripción de un factor master de una oleada posterior, como es el caso de la inducción de *rep1* que depende de Ste11. Además, una oleada transcripcional posterior inhibe a la anterior; así Mei4 inhibe la expresión de genes tempranos y Rep1 la de genes que se inducen en la entrada en meiosis (Mata et al., 2007; Mata et al., 2002).

2.3 Características de la Meiosis: Tipo de división especial

Como consecuencia del cambio de expresión génica durante meiosis, el comportamiento cromosómico durante el proceso va a ser muy diferente de lo que ocurre en mitosis. Así, a diferencia de lo que ocurre durante mitosis, en meiosis una única ronda de replicación del DNA es seguida por dos divisiones nucleares (MI y MII), por lo que se generan cuatro células haploides a partir de un parental diploide (Figura 3).

En meiosis, la cohesina mitótica Rad21 es sustituida por la cohesina Rec8, que está regulada de forma diferente en meiosis I y en meiosis II. En dicha regulación la proteína Shugoshina (Sgo1) juega un papel esencial (Clift y Marston, 2011).

Durante profase, las cromátidas hermanas de cada cromosoma homólogo están unidas en toda su extensión por las cohesinas. Además, el par de homólogos aparece unido por las uniones físicas entre sus brazos (quiasmas) que produce la recombinación (Figura 3). En meiosis I, la cohesina Rec8 es degradada de los brazos de los cromosomas por la Separasa (Cut1 en *S. pombe*, una cisteín proteasa, liberada por el complejo APC (*anaphase promoting complex*) al degradar a su inhibidor Securina) permitiendo la resolución de los quiasmas y la separación de los homólogos. Esta degradación no ocurre en los centrómeros donde se localiza la proteína Sgo1 que recluta a la fosfatasa PP2A (*protein phosphatase 2A*), manteniendo a Rec8 en un estado defosforilado (Kitajima et al., 2006; Riedel et al.,

2006). En este estado, Rec8 no es susceptible de ser degradada preservando así la cohesión centromérica de las cromátidas hermanas que segregarán hacia el mismo polo de la célula.

En meiosis II, el anclaje de los microtúbulos en los cinetocoros de las cromátidas hermanas, genera una tensión que presumiblemente distancia a Sgo1, lo que hace que Rec8 permanezca fosforilada y expuesta a degradación, permitiendo la segregación de las cromátidas hermanas a polos opuestos (Clift y Marston, 2011).

Se ha descrito que entre las quinasas encargadas de regular a Rec8, se encuentra Cdc5 (polo quinasa) en *S. cerevisiae* (Brar et al., 2006; Clyne et al., 2003), y la caseína quinasa I (Katis et al., 2010; Ishiguro et al., 2010; Rumpf et al., 2010) y la quinasa de ciclo DDK (quinasa dependiente de Dbf4) (Le et al., 2013; Katis et al., 2010) tanto en *S. cerevisiae* como en *S. pombe*.

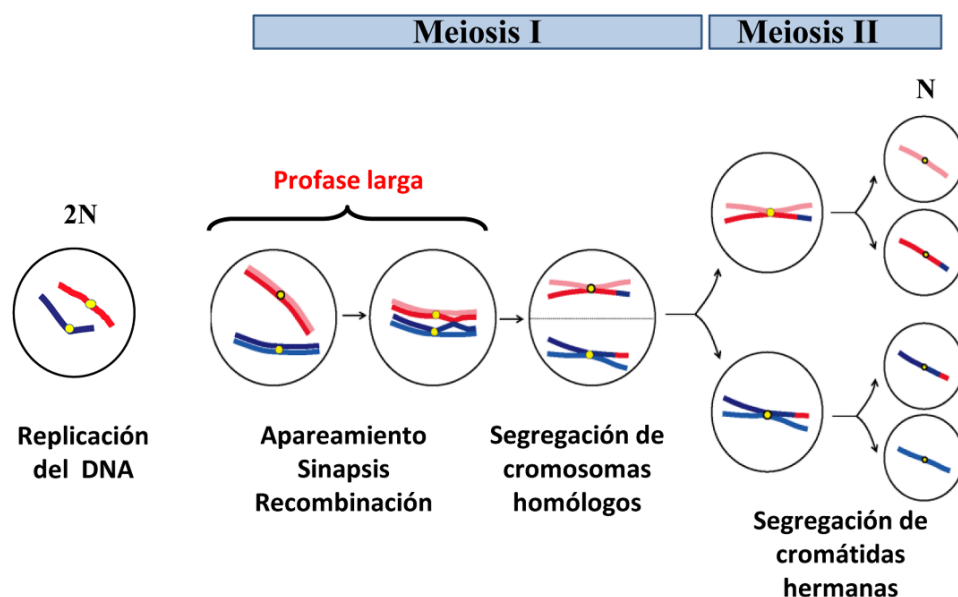


Figura 3. Esquema de la meiosis. Tras la replicación del DNA, es característica la existencia de una profase larga, en la que ocurre el apareamiento, la sinapsis y la recombinación meiótica entre los cromosomas homólogos. Tras la profase se suceden dos rondas de segregación: la Meiosis I, donde se separan los cromosomas homólogos; y la Meiosis II donde se separan las cromátidas hermanas.

La **profase meiótica** es el periodo que va desde la replicación del DNA hasta la primera segregación meiótica y es particularmente larga; en ella ocurre un evento muy importante denominado **recombinación meiótica**. La recombinación no sólo es esencial para generar diversidad genética, sino que gracias a los quiasmas se genera la tensión necesaria para la correcta segregación de los cromosomas en MI (Petronczki et al., 2003). Cabe recordar que una correcta segregación de los cromosomas contribuye a garantizar el mantenimiento de la viabilidad de las especies, y evita aneuploidías, que pueden asociarse

con enfermedades o síndromes genéticos, como la trisomía del cromosoma 21, comúnmente conocida como el Síndrome de Down en la especie humana (Hassold et al., 2007; Lamb et al., 2005).

2.3.1 Inicio de la recombinación meiótica

La recombinación ocurre en el contexto del complejo sinaptonémico que es una estructura proteica altamente organizada que se ensambla a lo largo del par de cromosomas homólogos (Zickler y Kleckner, 1999) (Figura 4A). Está favorecida por la adquisición en la profase meiótica de una arquitectura nuclear conservada pero especialmente llamativa en *S. pombe* denominada *bouquet*. Se denomina así porque la forma que adquieren los cromosomas mediante el agrupamiento de sus telómeros en el cuerpo polar del huso (SPB) recuerda a un ramo de flores (Chikashige et al., 2006; Tang et al., 2006; Bass et al., 2003; Scherthan, 2001). Esta estructura está presente durante toda la profase y favorece la interacción inicial entre cromosomas homólogos, previniendo la recombinación ectópica (Davis y Smith, 2006). Curiosamente, esta nueva arquitectura nuclear, en la que los telómeros se anclan al SPB y los centrómeros se liberan de él, es también necesaria para la correcta formación del huso meiótico y la maduración de los centrómeros (Katsumata et al., 2016; Klutstein et al., 2015; Fennell et al., 2015; Tomita et al., 2013). Además, en *S. pombe* es característico el movimiento de *horsetail* o cola de caballo, en el que el núcleo se desplaza rápidamente de un extremo a otro de la célula para favorecer el alineamiento y el apareamiento entre cromosomas homólogos. (Cromie y Smith, 2008; Yamamoto y Hiraoka, 2001) Los movimientos nucleares durante la profase meiótica también están conservados (Shibuya et al., 2014; Schertman et al., 2007).

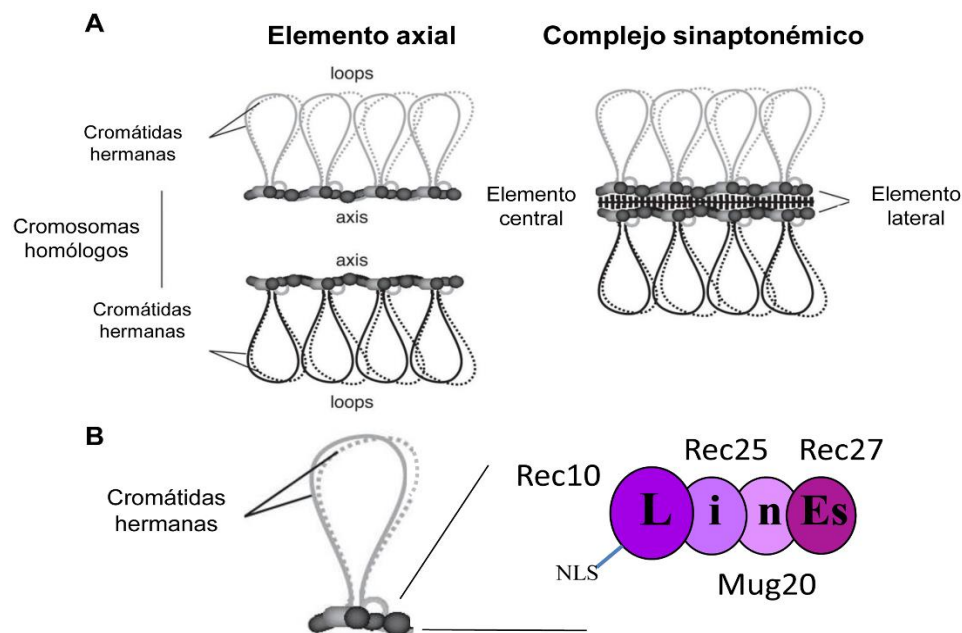


Figura 4. Arquitectura del genoma en profase meiótica. A) En *S. cerevisiae* y eucariotas superiores se forma el complejo sinaptonémico que es una estructura proteica que mantiene asociados a los cromosomas homólogos a lo largo de toda su extensión durante la profase meiótica. La localización de la proteína Zip1 en *S. cerevisiae* (SCP1/Syn1 en mamíferos) formando filamentos transversales en el centro del complejo ayuda a mantener conectados a los elementos laterales, con la intervención de otras proteínas como Zip3 y SUMO (Altmannová et al., 2012). B) En *S. pombe* no se forma un complejo sinaptonémico como tal, sino que la arquitectura se asemeja a la de los elementos axiales. El complejo proteico Rec10-Rec25-Rec27-Mug20 forman los elementos lineales (LinEs), que no se disponen de manera continua a lo largo del cromosoma (Fowler et al., 2013; Estreicher et al., 2012; Davis et al., 2008; Lorenz et al., 2004; Bahler et al., 1993), y carecen de proteínas de unión entre ellos. Figura adaptada de Lam y Keeney, 2014).

La recombinación comienza con la formación de la doble rotura del DNA (Double Strand Break, DSB) llevada a cabo por Rec12 (Spo11 en otros eucariotas), una proteína similar a las topoisomerasas de tipo II, en concreto a la subunidad A de la Topo VI de archeas. Rec12 cataliza la doble rotura del DNA gracias a un residuo de tirosina conservado (Tyr-98); actúa como una topoisomerasa realizando un corte de cadena sencilla en ambas hebras generando así un DSB, y solamente en uno de los cromosomas homólogos (Keeney, 2008). Los cortes no ocurren aleatoriamente en el genoma, sino que se concentran en regiones concretas donde la frecuencia de DSBs es alta, denominadas *hotspots*.

La localización de los DSBs está asociada a la arquitectura del genoma. Si consideramos que las especies tienen una arquitectura genómica diferente, es fácil entender que la localización de las roturas también lo sea, a pesar de que la proteína encargada de catalizar los DSBs está muy conservada en la evolución.

Los cortes se localizan preferentemente en zonas intergénicas grandes en *S. pombe* y en promotores en *S. cerevisiae* (Pan et al., 2011; Cromie et al., 2007). Además, la

estructura del cromosoma determinada por modificaciones de histonas, unión de factores de transcripción, cohesinas meióticas, etc, influyen en su distribución (Fowler et al., 2014; Fowler et al., 2013; Pan et al., 2011). Así pues, por ejemplo, en *S. cerevisiae* y en ratón la metilación de la histona H3 en la lisina 4 marca el sitio de la rotura siendo específica de meiosis en ratón (Smagulova et al., 2011), pero no en *S. cerevisiae* (Tischfield y Keeney, 2012; Borde et al., 2009); mientras que en *S. pombe* se asocia a la acetilación de la histona H3 en la lisina 9 (Yamada et al., 2013); en ratón y en humanos son dependientes de la secuencia de unión de la metil-transferasa PRDM9, fuertemente en ratón (Smagulova et al., 2011) y menos en humanos (Wang et al., 2012; Myers et al., 2008).

En *S. pombe*, el complejo Rec10-Rec25-Rec27-Mug20, que forman los elementos lineales (LinEs) (Figura 4B), es determinante de los sitios de DSBs; se une a ellos antes de que el corte ocurra, y su unión es proporcional a la frecuencia de corte. Sin embargo, mientras que Rec10 es esencial para la formación de DSBs (y la recombinación) en todo el genoma, el resto de componentes de los LinEs no lo son, manteniéndose en su ausencia niveles de DSBs (y recombinación) fuera de los *hotspots* (Fowler et al., 2013).

Las proteínas de los LinEs son pequeñas (16-17 kDa), excepto Rec10 (90 kDa) que además presenta una secuencia de localización nuclear (NLS). Así, es posible que esta proteína dirija el complejo al núcleo. Alternativamente, la formación del complejo en el núcleo (debido a la difusión pasiva de los componentes pequeños) podría promover su retención nuclear.

Los LinEs se describieron inicialmente por microscopia electrónica y citología, como estructuras similares a los elementos laterales del complejo sinaptonémico de otros eucariotas (Loidl, 2006; Lorenz et al., 2004) (Figura 4B). Todas las proteínas descritas hasta la fecha componentes de estas estructuras (Rec10, Rec25, Rec27 y Mug20) son esenciales para su formación. La formación de los LinEs no depende de la presencia de Rec12 y por tanto de la formación de DSBs, pero sí de una correcta cohesión cromosómica mediada por las cohesinas meióticas Rec8 y Rec11 (Fowler et al., 2013; Davis et al., 2008; Lorenz et al., 2004; Molnar et al., 2003; Molnar et al., 1995). Recientemente se ha descrito que la fosforilación de la cohesina meiótica (la subunidad Rec11) por caseína quinasa I promueve la interacción con Rec10 y la formación de los LinEs (Phadnis et al., 2015; Sakuno y Watanabe et al., 2015). Además, las cohesinas meióticas juegan un papel

esencial en la arquitectura cromosómica, ayudando a la compactación y el alineamiento espacial de los cromosomas homólogos (Ding et al., 2016; Ding et al., 2006).

Los LinEs sirven como plataforma para la carga de proteínas accesorias de recombinación (Bonfils et al., 2011; Lorenz et al., 2006) (Figura 5A), que son proteínas esenciales para que Rec12 lleve a cabo la doble rotura del DNA en el inicio de la recombinación (Cromie y Smith, 2008).

En *S. pombe* estas proteínas forman dos sub-complejos conservados evolutivamente, unidos por la proteína accesoria Mde2 (Miyoshi et al., 2012), de la cual no se ha descrito ortólogo en otras especies. Uno de los sub-complejos es el complejo de pre-recombinación SFT (Seven, Fifteen, Twenty four) formado por Rec7 (Rec114), Rec15 (Mer2) y Rec24 (Mei4). El segundo es el sub-complejo DSBC (DSB-Complex) formado por Rec6 (Rec102), Rec14 (Ski8) y Rec12 (Spo11). Ambos complejos están conservados en *S. cerevisiae* (proteínas entre paréntesis) y ratón (Robert et al., 2016; Bouuaert y Keeney, 2016; Miyoshi et al., 2012), lo que sugiere que su función en la carga y/o la activación de Rec12 en el sitio de corte también lo está (Figura 5A).

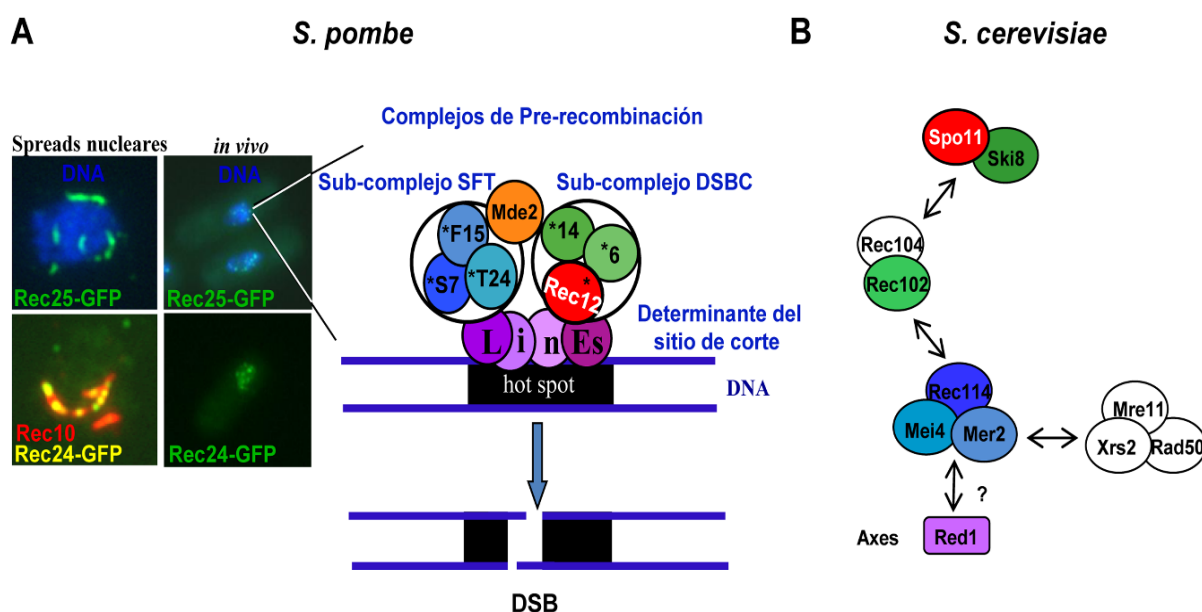


Figura 5: Formación de DSBs. A) Esquema del inicio de la recombinación meiótica de *S. pombe*. Los elementos lineales LinEs (Rec10-Rec25-Rec27-Mug20) se unen al sitio de recombinación, favorecido por una correcta cohesión cromosómica, sirviendo de plataforma para la unión de las proteínas accesorias de Rec12, las cuales interactúan entre sí formando dos sub-complejos: el sub-complejo SFT y el sub-complejo DSBC. Rec12 forma parte del segundo sub-complejo y cataliza la formación del DSB. A la izquierda se muestra la localización de los LinEs y de las proteínas accesorias en *spreads* nucleares y en células intactas *in vivo*. Los LinEs se observan formando estructuras lineales (Rec25 en verde y Rec10 en rojo) en los *spreads*, observándose a las proteínas accesorias (Rec24 en amarillo) ancladas sobre los LinEs. En células enteras, tanto las proteínas de los LinEs como las proteínas accesorias se localizan formando puntos discretos durante profase meiótica. B) En *S. cerevisiae* 10 proteínas se requieren para la formación del DSB interactuando en cuatro sub-complejos (adaptado de Lam y Keeney, 2014). El código de color indica las proteínas ortólogas en estas levaduras.

A pesar de la conservación de complejos, las proteínas accesorias están poco conservadas en la evolución, y tienen un porcentaje de identidad entre *S. cerevisiae* y *S. pombe* por lo general muy bajo (Robert et al., 2016; Kumar et al., 2010; Cole et al., 2010; Keeney, 2008). El hecho de que estas proteínas hayan divergido rápidamente en la evolución sugiere una adaptación para salvaguardar diferencias entre especies que aseguren la reproducción dirigida a miembros de la misma especie.

Otras proteínas están muy conservadas en ambos organismos, pero tienen funciones diferentes durante la recombinación como son el complejo MRN (*S. pombe*) y MRX (*S. cerevisiae*). Ambos son requeridos para la reparación de los DSBs pero en *S. cerevisiae* el complejo MRX también es necesario para la formación de los DSBs (Cao et al., 1990). Rec12 (Spo11) es la proteína con mayor porcentaje de identidad entre especies (entre un 20-30% en el dominio catalítico) (Keeney, 2008).

Se ha visto experimentalmente la importancia de las interacciones de las proteínas que forman los complejos. Así pues, por ejemplo, la proteína Rec24 del complejo SFT requiere Rec7 para que su localización en los cromosomas sea estable (Bonfils et al., 2011); y Mde2 se requiere para la estabilidad del complejo (Miyoshi et al., 2012). Por otro lado, Rec15 interacciona de forma directa consigo misma, con Rec10 y con Mde2; por tanto, Rec15 reclutaría al sub-complejo SFT a los LinEs mediante su interacción con Rec10 y a su vez atraería al sub-complejo DSBC mediante su interacción con Mde2, ya que Mde2 interacciona de forma directa con la proteína Rec14 del complejo DSBC (Miyoshi et al., 2012) (Figura 5A).

2.3.2 Procesamiento de los DSBs

En el procesamiento de los DSBs generados por Rec12 están involucradas multitud de proteínas, la mayoría conservadas (Ferreti et al., 2013; Cromie y Smith, 2008). El complejo MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) está altamente conservado en eucariotas, es requerido para producir la resección del extremo 5', eliminando a Rec12 del sitio de corte, gracias a su actividad endo- y exonucleasa, siendo esencial para la recombinación meiótica en todos los organismos en que se ha estudiado. En la generación de los extremos 3'-OH libres también colaboran otras nucleasas como son Ctp1 y Exo1 (Ma et al., 2015; Hartsuiker et al., 2009; Farah et al., 2009). Estos extremos 3'-OH de cadena sencilla son

recubiertos por Rad51 y Dmc1, ayudadas por sus proteínas accesorias que hacen posible su carga (Swi5, Sfr1, Rti1, Rad22, Rhp55, Rhp57). Uno de los filamentos así generados invade al cromosoma homólogo en búsqueda de una secuencia homóloga que sirva como molde para copiar la información perdida. Dicha invasión puede estabilizarse o no. Si no se estabiliza, la hebra invasora se eyecta y no se produce intercambio recíproco entre los cromosomas homólogos. Si por el contrario se estabiliza, se forma el denominado doble intermediario de Holliday que al resolverse dará lugar a intercambio recíproco entre los cromosomas homólogos, favoreciendo su unión física y por tanto su correcta segregación (Figura 16) (Heyer y Kanaar, 2004). En ambos casos se produce conversión génica ya que el heterodúplex de DNA generado en la invasión es reparado por el *mismatch repair*.

Estudios de microscopía electrónica han demostrado que la mayoría de las estructuras de Holliday formadas en *S. pombe* durante la recombinación meiótica son sencillas. Además, en los *hotspots* de recombinación la mayoría de los intercambios se realizan con la cromátida hermana y no con el cromosoma homólogo (Cromie et al., 2006). La resolución de las estructuras de Holliday se lleva a cabo por el complejo Mus81-Eme1 (Cromie et al., 2006; Boddy et al., 2001).

2.3.3 La recombinación meiótica en otras especies. Conservación funcional

Recientes hallazgos nos han acercado al conocimiento del inicio de la recombinación meiótica en diferentes organismos, sobre todo abordando a las proteínas que colaboran en la formación de los DSBs llevados a cabo por Spo11 (Tabla 1). Sin embargo, este corte inducido involucra una fina regulación a diferentes niveles (coordinación con la replicación, formación y reclutamiento de los sub-complejos de recombinación y coordinación con la organización física y espacial de la cromatina) que hasta la fecha siguen sin entenderse en la mayoría de las especies estudiadas (Lam y Keeney, 2014).

En el apartado 2.3.1, hemos hecho un repaso de las proteínas que intervienen en el inicio de la recombinación meiótica en *S. pombe*. Muchas de estas proteínas, a pesar de presentar cierta homología de secuencia con proteínas involucradas en la formación de DSBs en otras especies, no tienen una función bioquímica asociada, de algunas de ellas no se han encontrado ortólogos y otras pueden tener más protagonismo en unas especies que en otras.

La maquinaria de recombinación en *S. cerevisiae* está compuesta por 10 proteínas que forman cuatro sub-complejos, Spo11-Ski8, Rec102-Rec104, Rec114-Mei4-Mer2 y MRX (Mre11-Rad50-Xrs2) (Keeney, 2008; Maleki et al., 2007) (Figura 5B). Sus funciones bioquímicas no están claras, pero se han propuesto funciones en el reclutamiento de Spo11 a los sitios de corte, en su activación y en la coordinación con el entorno de la cromatina para establecer la localización y el tiempo en el que debe ocurrir la formación del DSB (ver apartado 3. Coordinación de la progresión por fase S y la recombinación). Así pues, por ejemplo, Ski8 en ciclo vegetativo tiene funciones en el metabolismo del RNA, pero en meiosis va al núcleo y favorece la localización nuclear de Spo11 y su asociación con la cromatina; Rec102-Rec104 interactúa con Spo11 y serviría de unión entre Spo11 y el sub-complejo Rec114-Mei4-Mer2 (Lam y Keeney, 2014). Recientemente se ha descrito en otras especies, desde levaduras hasta humanos, el ortólogo de Rec102, atribuyéndole un papel estrechamente asociado a la actividad de Spo11 por su homología estructural con la subunidad B de la Topo VI de archeas (Robert et al., 2016; Vrielynck et al., 2016; Bouuaert y Keeney, 2016).

Cabe mencionar que en *S. cerevisiae* los DSBs se forman preferentemente en zonas promotoras, en contextos de loops de cromatina. Estos loops se generan gracias a la arquitectura que adquieren los cromosomas al formarse el complejo sinaptonémico (Figura 4A) (Kleckner, 2006). La fosforilación de Mer2 por las quinasas de ciclo asociadas a la replicación del DNA, atrae la maquinaria de recombinación y favorece la interacción de Mer2 con Spp1 (una proteína del complejo COMPASS que reconoce la metilación de histona H3 en la lisina 4 de los promotores). Así, Spp1 actúa de puente para acercar el sitio de corte (en el loop), que se localiza cerca de donde se ha producido la marca de metilación, a los ejes de los cromosomas donde se localiza la maquinaria de recombinación, Mer2 (Lam y Keeney, 2014). Esta asociación de los sitios de corte con regiones promotoras no ocurre en otros organismos como *S. pombe* o ratón (Fowler et al., 2014; Brick et al., 2012; Smagulova et al., 2011; Cromie et al., 2007).

En **ratón** se conocen tres proteínas accesorias de Spo11, requeridas para la formación de DSBs, que son MEI1, MEI4 y REC114 (Lam y Keeney, 2014). MEI4 y REC114 se identificaron gracias a una aproximación filogenética utilizando motivos cortos conservados en las proteínas de levaduras (Kumar et al., 2010). MEI4 se localiza formando focos discretos sobre los ejes de los cromosomas tal y como se ha descrito en *S. cerevisiae* (Mei4) y en *S. pombe* (Rec24), de forma independiente a SPO11 (Rec12) (Bonfils et al.,

2011; Kumar et al., 2010; Maleki et al., 2007). MEI4 interacciona con REC114 a través de un motivo conservado en el extremo N-terminal (Kumar et al., 2010), al igual que sus ortólogos en *S. cerevisiae* y *S. pombe* (Steiner et al., 2010; Maleki et al., 2007).

Hasta el momento se sabe que los mutantes *Mei4* y *Mei1* presentan defectos en recombinación, pero aún se desconoce cómo MEI4 se recluta a la cromatina, qué papel tendría MEI1, si REC114 también es esencial para la formación de DSBs como indica su homología y si existen ortólogos de las demás proteínas accesorias de recombinación descritas en levaduras (Lam y Keeney, 2014).

Relacionado con este último punto, recientemente se ha descrito una familia conservada de proteínas, presentes desde levaduras hasta humanos, con fuerte homología estructural con la subunidad B de las TopoVI de archeas (Robert et al., 2016; Vrielynck et al., 2016; Bouuaert y Keeney, 2016). Esta familia incluye a TOPOVIBL de ratón que interacciona físicamente con Spo11 y se requiere para la formación de DSBs (Robert et al., 2016).

El complejo MRN (MRE11, RAD50, NBS1) también está presente en ratón y conserva su función en la reparación de DSBs meióticos (Cherry et al., 2007); pero no se sabe si funcionalmente se asemeja más al complejo de *S. pombe* o al de *S. cerevisiae*, donde además de para la reparación, se requiere para la formación de DSBs (Cao et al., 1990).

En *Drosophila melanogaster* sólo se conocen dos proteínas que se requieren para la formación de DSBs llevados a cabo por Mei-W68 (ortólogo de Spo11), Mei-P22 (el ortólogo de TOPOVIBL de ratón) (Robert et al., 2016; Bouuaert y Keeney, 2016) y Trem (*Trade embargo*) (Lake et al., 2011; Page et al., 2007). Se sabe que Mei-P22 se localiza de forma dependiente de Trem, formando focos discretos en los cromosomas meióticos, pero no se conoce el mecanismo. No se han descrito ortólogos de Trem (Lam y Keeney, 2014).

En *Caenorhabditis elegans* se han descrito varias proteínas que se requieren para el inicio de la recombinación aparte de Spo11, como son MRE-11, RAD-50, DSB-1, DSB-2, HIM-17, HIM-5 y HTP-3, pero no está claro si llevan a cabo funciones directas o indirectas en la formación de DSBs (Lam y Keeney, 2014).

DSB-1 es esencial para la formación de DSBs, mientras que su parálogo DSB-2 no es esencial, pero se requiere para que se produzcan de forma eficiente (Rosu et al., 2013;

[Stamper et al., 2013](#)). Ambas proteínas tienen un patrón de localización similar, mostrando una asociación a la cromatina en fases tempranas de la profase que no depende de la formación de DSBs pero si de la quinasa del *checkpoint* CHK-2 ([Rosu et al., 2013](#); [Stamper et al., 2013](#)). Los niveles de la proteína y la localización de DSB-2 dependen de DSB-1, y a su vez la localización de DSB-1 depende parcialmente de DSB-2, aunque estas proteínas no siempre co-localizan. No se han descrito parálogos de estas proteínas en otras especies del género *Caenorhabditis*.

Se ha propuesto que la unión de DSB-1 y DSB-2 a la cromatina representaría un estado permisivo para la formación de DSBs, y que la formación de intermediarios de recombinación induciría su eliminación de la cromatina, lo que presumiblemente inactivaría la formación de DSBs y representaría un mecanismo de control temporal de la formación de roturas. Ambas proteínas son dianas potenciales de quinasas de la familia ATM/ATR, pero se desconoce si son fosforiladas ([Rosu et al., 2013](#); [Stamper et al., 2013](#)).

HIM-17 se requiere para la formación de DSBs y la acumulación de la metilación de la histona H3 en la lisina 9 en los cromosomas profásicos, pero no se sabe si ambos procesos están relacionados; por tanto, podría tener un papel indirecto facilitando la unión de Spo11 a la cromatina o facilitando los cortes ([Reddy y Villeneuve, 2004](#)). Del mismo modo, HIM-5 promueve la recombinación específicamente en el cromosoma X y su localización en los cromosomas depende de HIM-17, pero tampoco se sabe si el efecto en la formación de DSBs es directo o indirecto modulando la cromatina ([Meneely et al., 2012](#)).

HTP-3 es parólogo del componente axial HIM-3 (homólogo de Hop1 en *S. cerevisiae*) que forma un complejo con MRE-11, RAD-50 y HIM-3. La asociación de HTP-3 tanto en los ejes cromosómicos como con la maquinaria de recombinación (en *C. elegans* MRE-11/RAD-50 se necesitan para la formación de DSBs) se ha propuesto como un mecanismo para asociar ambos procesos, el alineamiento de los cromosomas homólogos y su sinapsis con la formación de roturas ([Goodyer et al., 2008](#)). Como en este organismo los DSBs no son necesarios para el apareamiento de los cromosomas homólogos, el papel de HTP-3 en la formación de roturas probablemente refleje una función independiente.

<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>M. musculus</i>	<i>C. elegans</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>A. thaliana</i>
Rec7	Rec114	REC114			PHS1*
Rec24	Mei4	MEI4			PRD2
Rec15	Mer2				
Rec14	Ski8	WRD61			SKI8/VIP3
Rec12	Spo11	SPO11	SPO11	Me1-W68	SPO11-1 SPO11-2 SPO11-3*
Rec6	Rec102	TOPOVIBL		Mei-P22	MTOPVIB
Mde2					
Rad32*	Mre11	MRE11	MRE-11		MRE11*
Rad50*	Rad50	RAD50	RAD-50*		RAD50*
Nbs1*	Xrs2	NBS1			
		MEI1			PRD1
			DSB-1		
			DSB-2*		
				Trem	
					PRD3
					SWI1
					DFO
Rec10	Red1*				
Hop1*	Hop1*	HORMAD1*	HIM3*, HTP1*, HTP2*, HTP3*		ASY1*

Tabla 1. Lista de proteínas necesarias para la formación de DSBs en diferentes organismos. Con asteriscos se señalan las proteínas que no son esenciales para la formación de DSBs (por ejemplo, DSB-2 en *C. elegans*) o que lo son según la especie que estudiemos (como es el caso del complejo MRN que en *S. pombe* no se requiere para la formación de DSBs pero sí para su reparación mientras que en *S. cerevisiae*, se requiere para ambos procesos). Tabla adaptada de Lam y Keeney, 2014.

3. Coordinación de la progresión por fase S y la recombinación

La replicación *per se* no es necesaria para la formación de DSBs ya que cuando se inhibe el inicio de la replicación, tanto en *S. pombe* como en *S. cerevisiae* utilizando un mutante *cdc18* o eliminando *cdc6* que bloquean el disparo de los orígenes de replicación, se producen DSBs meióticos (dependientes de Rec12) (Hochwagen et al., 2005; Murakami y Nurse, 2001). Sin embargo, ambos procesos están coordinados, de hecho, cambios en el número de orígenes de replicación desencadena cambios proporcionales en la recombinación meiótica (Wu y Nurse., 2014).

3.1 Coordinación por el *checkpoint* de fase S

Para asegurar la viabilidad de los organismos y de sus descendientes debe haber una fina coordinación entre las distintas etapas del ciclo celular tanto mitótico como meiótico, lo que proporciona estabilidad genómica. Los *checkpoints* son rutas de señalización que

monitorizan la progresión del ciclo celular asegurando la correcta finalización de cada una de sus etapas de modo que no se inicia un evento tardío hasta que se ha completado con éxito uno más temprano. Así, proporcionan a las células un tiempo adicional para solventar problemas antes de proseguir en el ciclo. Uno de estos problemas es el daño en el DNA que no sólo se produce de forma accidental por factores intrínsecos y extrínsecos a la célula, sino que también puede producirse de forma programada, como ocurre en la formación de DSBs en la recombinación meiótica, o por ejemplo, en el cambio de tipo sexual en levaduras (Longhese et al., 2008).

La ruta de señalización del *checkpoint* del daño al DNA está compuesta por sensores que detectan el daño, adaptadores que favorecen la comunicación entre sensores y efectores, y quinasas efectoras que ejecutan una respuesta frente a una o varias dianas concretas. Así en *S. pombe* el *checkpoint* de fase S está compuesto por el sensor Rad3 (Mec1 en *S. cerevisiae*), que gracias a Rad26 (Ddc2) detecta cadena sencilla de DNA y, por tanto, desacoplamientos en la horquilla de replicación; por los adaptadores Mrc1 (Mrc1) y Crb2 (Rad9); y las quinasas efectoras Cds1 (Rad53) y Chk1 (Chk1) (Melo y Toczyski, 2002; Boddy y Russel, 2001).

Durante la meiosis la progresión por fase S debe estar coordinada con la recombinación para que no sucedan roturas en el DNA antes de la finalización de la replicación. Tanto en *S. pombe* como en *S. cerevisiae* la ruta Rad3-Cds1 (Mec1-Rad53) impide la generación de DSBs meióticos cuando se inhibe la fase S pre-meiótica en presencia de hidroximetilurea (agente genotóxico que depleciona dNTPs). En *S. pombe* este *checkpoint* suprime la transcripción de *mei4*, un factor de transcripción que regula muchos genes meióticos, incluido *mde2*, que codifica una de las proteínas accesorias de Rec12, y por tanto esencial para la formación de DSBs; aunque parece que este no es el único mecanismo mediante el que el *checkpoint* ejerce esta función (Ogino y Masai, 2006; Gregan et al., 2005) (Figura 6A). En *S. cerevisiae*, la ruta Mec1-Rad53 previene la fosforilación de Mer2, inhibiendo a la quinasa DDK, y por tanto el reclutamiento de la maquinaria de recombinación (ver apartado 3.2). También, se ha sugerido que previene la fosforilación de Rec104, puesto que esta proteína migra más rápido cuando el *checkpoint* está activo. Además, Mec1 reduce los niveles del transcrito de *spo11* y desestabiliza la unión de Rec114 y Mre11 a la cromatina de forma independiente a Rad53. (Keeney et al., 2014; Blitzblau y Hochwagen, 2013) (Figura 6B). Por otro lado, se ha descrito que la

fosforilación de la proteína accesoria Rec114 por las quinasas del *checkpoint* Mec1/Tel1 inhibe la formación de DSBs (Carballo et al., 2013).

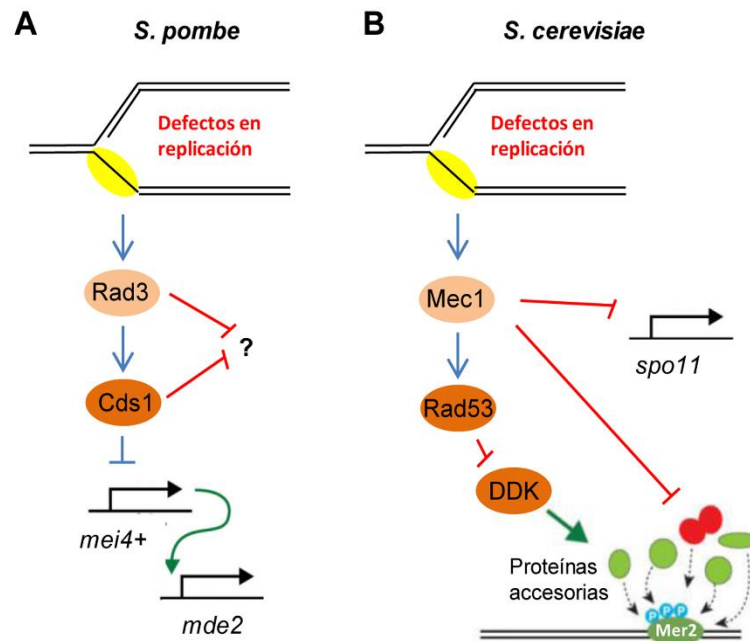


Figura 6. Coordinación de la replicación y la recombinación llevada a cabo por el *checkpoint* de fase S. A) En *S. pombe* defectos en la replicación conllevan a un bloqueo de la recombinación llevado a cabo por el *checkpoint* de fase S. Rad3 (quinasa sensora) activa a Cds1 (quinasa efectora) inhibiendo así la transcripción del factor de transcripción master de genes medianos, *mei4*, que además regula la transcripción del gen que codifica a una proteína accesoria esencial para la recombinación, *mde2*. Posiblemente el *checkpoint* actúe frente a otras dianas desconocidas hasta el momento. B) En *S. cerevisiae* la misma ruta del *checkpoint* se encarga de bloquear la recombinación, en este caso inhibiendo a DDK y por ende la fosforilación de la proteína accesoria Mer2. Además, Mec1 (Rad3 en *S. pombe*) reduce los niveles del transcrito de *spo11* e inhibe la formación de DSBs de forma no dependiente de Rad53 (Cds1 en *S. pombe*) (adaptado de Keeney et al., 2014).

En meiosis, existe un *checkpoint* específico denominado genéricamente *checkpoint* de recombinación que se encarga de bloquear la entrada en meiosis I ante defectos en el apareamiento con el cromosoma homólogo, la sinapsis y la propia recombinación. El *checkpoint* de recombinación se considera una variante del *checkpoint* del daño al DNA durante mitosis con algunos elementos específicos dado el contexto cromosómico en el que se generan los DSBs meióticos (Longhese et al., 2008; Pérez-Hidalgo et al., 2008a). Durante la meiosis la quinasa sensora Rad3 (Mec1) media la activación de una quinasa efectora específica de meiosis, Mek1 (Mek1), que en el caso de *S. pombe* fosforila a Cdc25 excluyéndolo del núcleo e impidiendo la activación de Cdc2, y por tanto la entrada en meiosis I (Pérez-Hidalgo et al., 2008a; Pérez-Hidalgo et al., 2008b; Pérez-Hidalgo et al., 2003; Shimada et al., 2002).

3.2 Coordinación por las quinasas de ciclo

En *S. cerevisiae* se ha descrito que la coordinación entre fase S y recombinación la llevan a cabo las **quinasas de ciclo**, CDK y DDK. Mer2 es una proteína accesoria de Spo11, cuyo ortólogo en *S. pombe* es Rec15, que es fosforilada en la serina 30 por la actividad CDK específica de fase S creando un ambiente ácido para que DDK fosforile a la serina 29 adyacente. Estas fosforilaciones son importantes para la interacción de Mer2 con otras proteínas accesorias y para la formación de DSBs (Sasanuma et al., 2008; Wan et al., 2008; Henderson et al., 2006). Se ha propuesto que baja actividad CDK promovería la fase S y niveles mayores la recombinación, lo que explicaría que ambas etapas no ocurriesen al mismo tiempo (Murakami y Keeney, 2008; Henderson et al., 2006). La proteína Mer2 está unida al DNA desde el inicio de fase S y es fosforilada por la actividad DDK, que viaja con el replisoma, cuando pasa la horquilla de replicación; de esta forma, sólo se inicia la recombinación después de la replicación (Murakami y Keeney, 2014b; Murakami y Keeney, 2014a) (Figura 7).

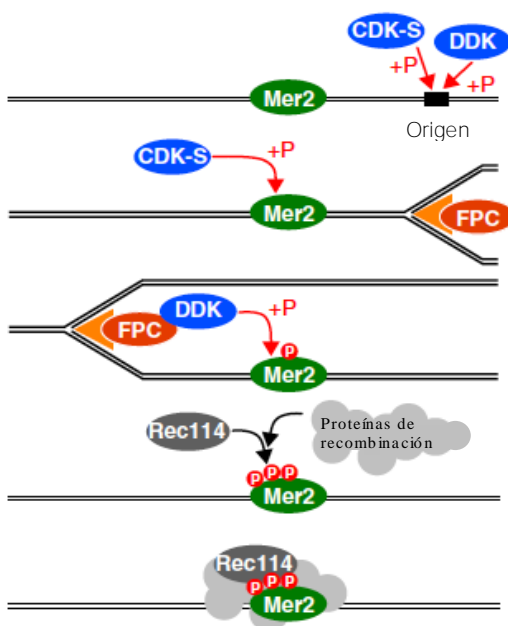


Figura 7. Coordinación de la fase S y la recombinación llevada a cabo por las quinasas de ciclo en *S. cerevisiae*. La quinaasa dependiente de ciclina (CDK) y la quinaasa dependiente de Dbf4 (DDK) se requieren para el inicio de la replicación activando los orígenes de replicación. La proteína accesoria Mer2 es fosforilada por CDK y a continuación por DDK que viaja con la horquilla de replicación gracias a su asociación con el complejo FPC (Fork Protection Complex); así se evitan DSBs en fase S ya que Mer2 es fosforilada una vez completada la replicación. La fosforilación de Mer2 atrae a la maquinaria de recombinación al sitio de corte. Figura tomada de Murakami y Keeney, 2014a.

En *S. pombe* podría existir también una coordinación llevada a cabo por las quinasas de ciclo. Sin embargo, se ha descrito que la actividad CDK no es esencial para la formación de DSBs como sí lo es en *S. cerevisiae* (Murakami y Nurse, 2001); aunque no se ha estudiado si es necesaria.

Por otro lado, la actividad DDK es importante para la formación de DSBs en *S. pombe*. El mutante termosensible *hsk1-89* que a altas temperaturas puede completar la fase

S, muestra un defecto severo en la formación de DSBs incluso en ausencia de las quinasas efectoras del *checkpoint*. Esto sugiere que la ausencia de DSBs no es debida a la activación del *checkpoint* sino a un papel directo de DDK en la formación de DSBs (Ogino et al., 2006).

El hecho de que en *S. pombe* genes implicados en ambos procesos, replicación y recombinación, estén bajo el control de las mismas rutas de activación transcripcional (Mata et al., 2007; Mata et al., 2002; Murakami y Nurse, 2001), hace pensar en la existencia de un mecanismo de coordinación entre ambos procesos para que ocurran de forma ordenada.

4. Actividad CDK durante la meiosis

La actividad CDK (quinasa dependiente de ciclina) promueve la progresión de la meiosis tal y como ocurre en la mitosis. Constituye un heterodímero formado por una subunidad catalítica (quinasa) y una subunidad reguladora (ciclina). Diferentes niveles del complejo quinasa-ciclina determinan el proceso que debe ocurrir favoreciendo que se produzca en el momento idóneo. Se sabe que la quinasa se mantiene a niveles constantes, oscilando su actividad debido a mecanismos que regulan su función catalítica. Puede considerarse que la ciclina es el regulador primario de la quinasa, ya que su unión constituye el primer paso en el proceso de activación (Morgan, 1995). Además, dependiendo de la ciclina que se induzca, de su nivel de expresión y de su tasa de degradación, se generan diferentes oleadas de actividad del complejo que contribuyen a asegurar el orden de los eventos durante el ciclo celular (Arellano y Moreno, 1997; Pines, 1996).

Las **ciclinas**, como subunidades reguladoras, llevan a cabo diferentes funciones como son activar la quinasa CDK, reconocer el sustrato, localizar el complejo y son dianas de inhibidores de la actividad CDK (Arellano y Moreno, 1997; Pines, 1996). La homología entre las ciclinas de diferentes especies, e incluso entre las ciclinas de una misma especie, en la mayoría de los casos se limita exclusivamente a una región interna de unos 100 aminoácidos denominada “caja de la ciclina”, que es esencial para la unión a CDK y para su activación (Lees y Harlow, 1993; Kobayashi et al., 1992). De forma general, se pueden diferenciar dos tipos de ciclinas dependiendo de cuándo ejercen su papel: las ciclinas

mitóticas que se unen a la CDK durante G2 y regulan la entrada en mitosis; y las ciclinas de G1 que regulan la entrada en fase S.

En *S. pombe* hay descritas tres ciclinas de G1, Cig1, Cig2 y Puc1, y sólo una ciclina de G2, Cdc13. Todas estas ciclinas se asocian a una única CDK denominada **Cdc2** que controla la progresión por todo el ciclo celular. Además de su regulación por asociación a la ciclina, la actividad CDK también se regula por fosforilación de la propia quinasa en la treonina 167 en el denominado “T-loop” por CAKs (*CDK-activating kinases*) que estabiliza la unión de la quinasa y la ciclina, y desbloquea el centro catalítico; por fosforilación/desfosforilación del residuo tirosina 15 del propio centro catalítico llevada a cabo por las quinasas Wee1 y Mik1, y la fosfatasa Cdc25; y por la unión del inhibidor Rum1 (Moser y Russell, 2000).

En meiosis, la actividad Ciclina-Cdc2 es necesaria para realizar la fase S pre-meiótica, la Meiosis I y la Meiosis II, y comparte con la actividad mitótica algunas ciclinas como son Cig1, Cig2 y Cdc13; sin embargo, no se ha descrito un papel claro en la recombinación (Pérez-Hidalgo et al., 2008a).

Cdc13 es la ciclina que regula la entrada en mitosis durante ciclo vegetativo (Booher et al., 1989; Moreno et al., 1989). Es la única ciclina esencial en el ciclo mitótico y en ausencia de ciclinas de G1 (Cig1, Cig2 y Puc1) es capaz de promover la entrada en fase S (Coudreuse y Nurse, 2010; Martín-Castellanos et al., 2000; Fisher y Nurse, 1996; Mondesert et al., 1996). En meiosis, Cdc13 también tiene un papel tanto en Meiosis I como en Meiosis II (Iino et al., 1995) y aparece al final de fase S manteniéndose alta hasta MII (Blanco et al., 2001; Murakami y Nurse, 1999) (Figura 8). Para entrar en anafase I la actividad CDK debe disminuir y esto se consigue mediante proteólisis de Cdc13 activada por el complejo APC (*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*). Sin embargo, el inhibidor de APC Mes1 evita que Cdc13 sea degradada completamente en anafase I preservando así actividad CDK suficiente para llevar a cabo MII (Izawa et al., 2005), tras lo cual será completamente degradada. Al contrario de lo que ocurría en mitosis, mutantes de delección de ciclinas de G1 se bloquean en meiosis en la transición G1/S indicando que Cdc13 no puede suplir su ausencia (Malapeira et al., 2005). Sin embargo, recientemente se ha descrito que niveles moderados de sobreexpresión de la proteína de fusión Cdc2-Cdc13 son suficientes para llevar a cabo la progresión de la meiosis en ausencia de las demás ciclinas (Gutiérrez-Escribano y Nurse, 2015).

Como se mencionó anteriormente las clicinas Cig1, Cig2 y Puc1 controlan la progresión por G1 en ciclo vegetativo (Martín-Castellanos et al., 2000; Fisher y Nurse, 1996; Martín-Castellanos et al., 1996; Monderset et al., 1996; Connolly y Beach, 1994; Forsburg y Nurse, 1994; Obara-Ishihara y Okayama, 1994). En el caso de Cig1 y Puc1 lo harían indirectamente controlando la estabilidad del inhibidor de CDK Rum1 (Martín-Castellanos et al., 2000; Benito et al., 1998).

Durante la meiosis **Cig2** tiene un patrón de expresión bifásico. Se induce antes de la fase S pre-meiótica de manera dependiente del factor de transcripción MBF (Cdc10-Rep1-Res2) y posteriormente presenta otro pico de inducción durante las divisiones meióticas, en este caso de manera dependiente del factor de transcripción Mei4 utilizando un sitio de inicio de la transcripción alternativo (Figura 8). Ambos picos de inducción se correlacionan con actividad quinasa siendo esta mayor en el segundo pico de inducción. En el mutante de delección de *cig2* se observa un retraso de media hora en la entrada en fase S pre-meiótica y en la entrada en MI, y se detectan problemas de segregación en MII (producción de diadas) (Gutiérrez-Escribano y Nurse, 2015; Borgne et al., 2002).

Durante la profase meiótica los niveles de Cig2 disminuyen. Además, se ha visto que la actividad global CDK también decae, a la vez que aumentan los niveles de la quinasa inhibidora Wee1 y de la fosforilación del residuo tirosina 15 de Cdc2 que mantendrán inhibidos los complejos CDK hasta la entrada en MI (Borgne et al., 2002; Daya-Makin et al., 1992). Sin embargo, este hecho no excluye un posible papel del complejo CDK en esta fase de la meiosis, ya que no hay una reducción total de su actividad (Borgne et al., 2002).

Cig1 también se expresa en meiosis con un pico de expresión en fases tempranas (Blanco et al., 2001) (Figura 8). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en ciclo vegetativo parece tener un papel minoritario en meiosis ya que la doble delección *cig1 cig2* presenta sólo un ligero retraso en el inicio de la fase S comparado con el mutante sencillo $\Delta cig2$ (Borgne et al., 2002).

Por último, el mensajero de la ciclina **Puc1** se mantiene constante durante ciclo vegetativo y aumenta en escasez de nutrientes (Fosburg y Nurse, 1994) (Figura 8). De hecho, en ciclo vegetativo esta ciclina contribuye a la progresión por G1 especialmente en condiciones nutricionales comprometidas (Martín-Castellanos et al., 2000). A pesar de la caída de expresión brusca al entrar en meiosis, Puc1 podría estar implicado en progresión

por meiosis, ya que el mutante de delección presenta un fenotipo aditivo en la entrada en fase S combinado con el mutante doble $\Delta cig1 \Delta cig2$ (Gutiérrez-Escribano y Nurse, 2015).

Además de estas ciclinas compartidas con el programa vegetativo, se han descrito dos ciclinas específicas de meiosis de inducción fuerte: Rem1 y Crs1 (Figura 8).

Rem1 tiene su pico máximo de inducción en la entrada en MI y el mutante $\Delta rem1$ presenta un retraso en la entrada en MI (Figura 8). Este pico de expresión se adelanta cuando Cig2 no está presente, contribuyendo a la entrada en fase S pre-meiótica, y de hecho el doble mutante $\Delta cig2 \Delta rem1$ se bloquea sin replicar el DNA. Además, se ha descrito un fenotipo de recombinación meiótica, disminuyendo la recombinación intragénica pero no afectando la recombinación intergénica (Malapeira et al., 2005) (ver apartado de Resultados 2.1.1 Ensayos de recombinación para la descripción de los tipos de recombinación). Sin embargo, en nuestras manos este fenotipo no es reproducible (Bustamante, 2015).

La expresión de Rem1 está regulada por Cig2. El mensajero de *rem1* tiene un intrón que se procesa de forma Mei4-dependiente justo en MI para producir la proteína Rem1. Cig2 inhibe este procesamiento, lo que explica que en ausencia de Cig2, se adelante la expresión de la proteína Rem1 (Malapeira et al., 2005). Sin embargo, es posible que parte de esta regulación se deba a la presencia de un RNA antisentido que se expresa en ciclo vegetativo y decae en meiosis (Chen et al., 2012). El papel descrito en recombinación lo llevaría a cabo una proteína truncada (sin “caja de la ciclina”) que se produciría antes del procesamiento del intrón que contiene un codón de parada (Maldón et al., 2008).

Crs1 es una ciclina poco estudiada que se identificó en un escrutinio por presentar su delección defectos leves en la segregación meiótica (Martín-Castellanos et al., 2005). Ya se había utilizado como herramienta, al igual que *rem1*, para el estudio del procesamiento de intrones como mecanismo de regulación de expresión génica específica de meiosis. Al igual que Rem1, la sobreexpresión de Crs1 es tóxica en ciclo vegetativo (Averbeck et al., 2005; Malapeira et al., 2005). Por los análisis de expresión de “meiosis y esporulación” extraídos de PomBase, *expression viewer* y *transcriptome viewer* (Wood et al., 2012; Wilhelm et al., 2008; Mata et al., 2002), y regulación de su mensajero (Chen et al., 2011; McPheeters et al., 2009; Averbeck et al., 2005), se deduce que se trata de una ciclina exclusiva de meiosis, que se expresa sólo en fases tempranas con una inducción máxima en la profase meiótica (Figura 8).

Como se mencionó anteriormente, la “caja de la ciclina” es la marca que identifica todas estas proteínas y su homología se utiliza para su clasificación. Suele ser una secuencia con un dominio N-terminal y otro C-terminal. Puc1 y Crs1 sólo presentan uno de estos dominios, el dominio N-terminal. La homología entre las diferentes ciclinas de *S. pombe* aparece representada en la [Figura 8C, Tabla](#).

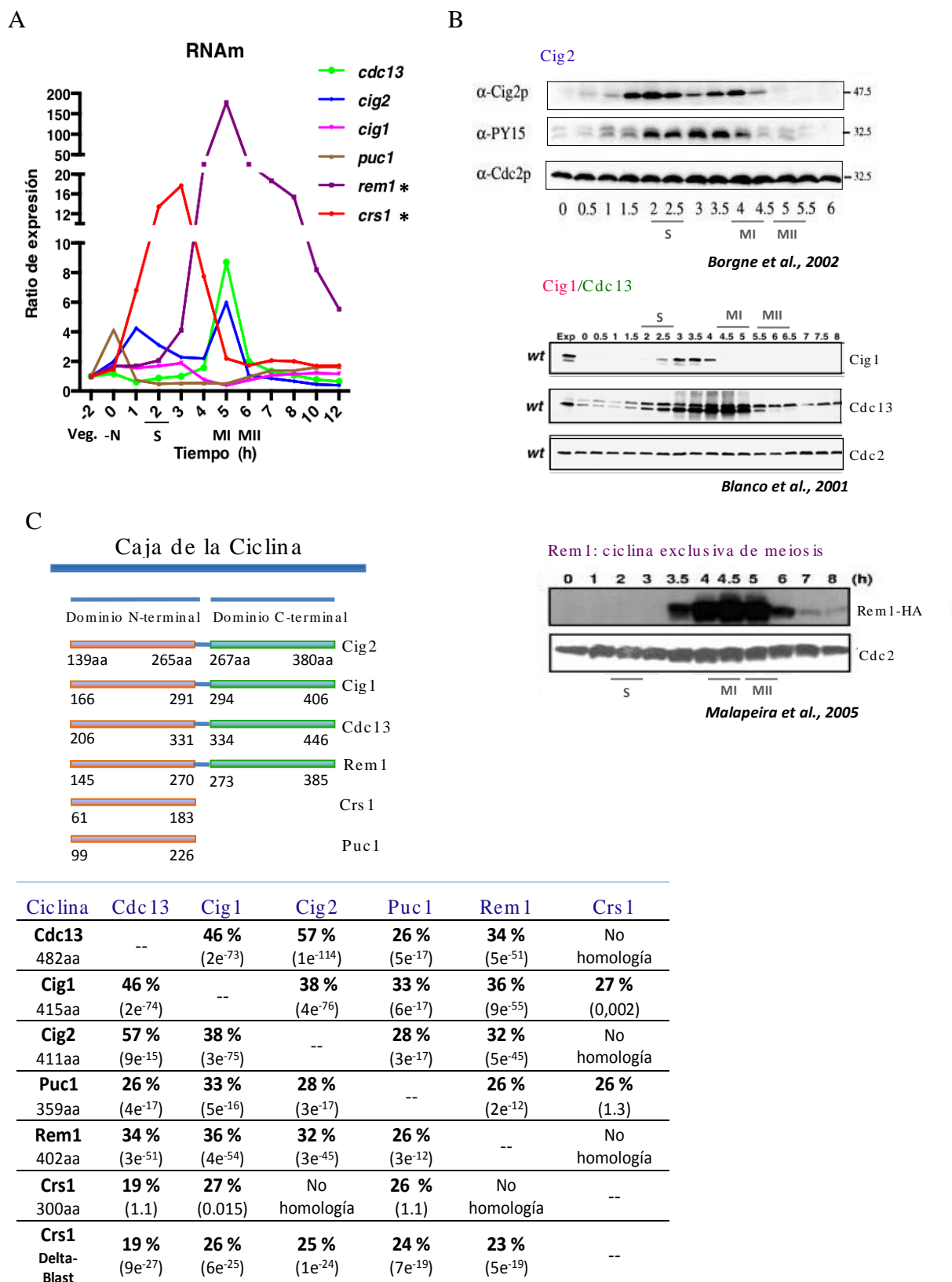


Figura 8. Expresión de ciclinas durante meiosis en *S. pombe*. A) Niveles de mensajero. Datos tomados de Mata et al., 2002 (PomBase, *expression viewer*). El asterisco indica las ciclinas exclusivas de meiosis. B) Niveles de proteína. Figuras tomadas de las publicaciones indicadas. C) Comparación de las secuencias de las ciclinas. En la parte de arriba se compara la estructura del dominio “caja de la ciclina”; datos tomados de Pfam (PomBase). En la tabla se compara la secuencia proteica mediante Blastp (% de identidad), y en el caso de Crs1 también con Delta-Blast (aparte de la secuencia primaria de la proteína tiene en consideración la conservación de dominios). Entre paréntesis se indica el valor E. Un valor de 1 significa que por azar se puede encontrar una secuencia similar a la secuencia problema en todo el genoma. Cuanto más cercano a 0 más significativa es la comparación.



OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Determinar si la actividad CDK es necesaria para la formación de DSBs meióticos en *Schizosaccharomyces pombe*.
2. Identificar los complejos Ciclina/Cdc2 implicados.
3. Identificar puntos de regulación.



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, H., and Shimoda, C. (2000). Autoregulated expression of *Schizosaccharomyces pombe* meiosis-specific transcription factor Mei4 and a genome-wide search for its target genes. *Genetics* 154, 1497–1508.
- Alani, E., Padmore, R., and Kleckner, N. (1990). Analysis of wild-type and rad50 mutants of yeast suggests an intimate relationship between meiotic chromosome synapsis and recombination. *Cell* 61, 419–436.
- Allers, T., and Lichten, M. (2001). Differential Timing and Control of Noncrossover and Crossover Recombination during Meiosis. *Cell* 106, 47–57.
- Altmannová, V., Kolesár, P., and Krejčí, L. (2012). SUMO Wrestles with Recombination. *Biomolecules* 2, 350–375.
- Alves-Rodrigues, I., Ferreira, P.G., Moldón, A., Vivancos, A.P., Hidalgo, E., Guigó, R., and Ayté, J. (2016). Spatiotemporal Control of Forkhead Binding to DNA Regulates the Meiotic Gene Expression Program. *Cell Reports* 14, 885–895.
- Aoi, Y., Kawashima, S.A., Simanis, V., Yamamoto, M., and Sato, M. (2014). Optimization of the analogue-sensitive Cdc2/Cdk1 mutant by in vivo selection eliminates physiological limitations to its use in cell cycle analysis. *Open Biol* 4.
- Arellano, M., and Moreno, S. (1997). Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29, 559–573.
- Averbeck, N., Sunder, S., Sample, N., Wise, J.A., and Leatherwood, J. (2005). Negative Control Contributes to an Extensive Program of Meiotic Splicing in Fission Yeast. *Molecular Cell* 18, 491–498.
- Bähler, J., Wyler, T., Loidl, J., and Kohli, J. (1993). Unusual nuclear structures in meiotic prophase of fission yeast: a cytological analysis. *J. Cell Biol.* 121, 241–256.
- Bähler, J., Wu, J.Q., Longtine, M.S., Shah, N.G., McKenzie, A., Steever, A.B., Wach, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R. (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 14, 943–951.
- Bass, H.W. (2003). Telomere dynamics unique to meiotic prophase: formation and significance of the bouquet. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 60, 2319–2324.
- Benito, J., Martín-Castellanos, C., and Moreno, S. (1998). Regulation of the G1 phase of the cell cycle by periodic stabilization and degradation of the p25^{rum1} CDK inhibitor. *EMBO J.* 17, 482–497.
- Blanco, M.G., and Matos, J. (2015). Hold your horSSEs: controlling structure-selective endonucleases MUS81 and Yen1/GEN1. *Front Genet* 6.
- Blanco, M.A., Sanchez-Diaz, A., de Prada, J.M., and Moreno, S. (2000). APC^{ste9/srw1} promotes degradation of mitotic cyclins in G1 and is inhibited by cdc2 phosphorylation. *EMBO J* 19, 3945–3955.
- Blanco, M.A., Pelloquin, L., and Moreno, S. (2001). Fission yeast mfr1 activates APC and coordinates meiotic nuclear division with sporulation. *J Cell Sci* 114, 2135–2143.
- Blitzblau, H.G., and Hochwagen, A. (2013). ATR/Mec1 prevents lethal meiotic recombination initiation on partially replicated chromosomes in budding yeast. *eLife* 2.
- Boddy, M.N., and Russell, P. (2001). DNA replication checkpoint. *Current Biology* 11, R953–R956.

- Boddy, M.N., Gaillard, P.-H.L., McDonald, W.H., Shanahan, P., Yates 3rd, J.R., and Russell, P. (2001). Mus81-Eme1 Are Essential Components of a Holliday Junction Resolvase. *Cell* 107, 537–548.
- Bonfils, S., Rozalén, A.E., Smith, G.R., Moreno, S., and Martín-Castellanos, C. (2011). Functional interactions of Rec24, the fission yeast ortholog of mouse Mei4, with the meiotic recombination–initiation complex. *J Cell Sci* 124, 1328–1338.
- Booher, R.N., Alfa, C.E., Hyams, J.S., and Beach, D.H. (1989). The fission yeast *cdc2/cdc13/suc1* protein kinase: Regulation of catalytic activity and nuclear localization. *Cell* 58, 485–497.
- Borde, V., Robine, N., Lin, W., Bonfils, S., Géli, V., and Nicolas, A. (2009). Histone H3 lysine 4 trimethylation marks meiotic recombination initiation sites. *EMBO J* 28, 99–111.
- Borgne, A., Murakami, H., Ayté, J., and Nurse, P. (2002). The G1/S Cyclin Cig2p during Meiosis in Fission Yeast. *Mol Biol Cell* 13, 2080–2090.
- Bouuaert, C.C., and Keeney, S. (2016). Breaking DNA. *Science* 351, 916–917.
- Brick, K., Smagulova, F., Khil, P., Camerini-Otero, R.D., and Petukhova, G.V. (2012). Genetic recombination is directed away from functional genomic elements in mice. *Nature* 485, 642–645.
- Bueno, A., Richardson, H., Reed, S.I., and Russell, P. (1991). A fission yeast B-type cyclin functioning early in the cell cycle. *Cell* 66, 149–159.
- Cao, L., Alani, E., and Kleckner, N. (1990). A pathway for generation and processing of double-strand breaks during meiotic recombination in *S. cerevisiae*. *Cell* 61, 1089–1101.
- Carballo, J.A., Panizza, S., Serrentino, M.E., Johnson, A.L., Geymonat, M., Borde, V., Klein, F., and Cha, R.S. (2013). Budding Yeast ATM/ATR Control Meiotic Double-Strand Break (DSB) Levels by Down-Regulating Rec114, an Essential Component of the DSB-machinery. *PLoS Genet* 9.
- Carpy, A., Krug, K., Graf, S., Koch, A., Popic, S., Hauf, S., and Macek, B. (2014). Absolute proteome and phosphoproteome dynamics during the cell cycle of *Schizosaccharomyces pombe* (Fission Yeast). *Mol. Cell Proteomics* 13, 1925–1936.
- Cervantes, M.D., Farah, J.A., and Smith, G.R. (2000). Meiotic DNA Breaks Associated with Recombination in *S. pombe*. *Molecular Cell* 5, 883–888.
- Chen, H.-M., Rosebrock, A.P., Khan, S.R., Futcher, B., and Leatherwood, J.K. (2012). Repression of Meiotic Genes by Antisense Transcription and by Fkh2 Transcription Factor in *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS ONE* 7, e29917.
- Cherry, S.M., Adelman, C.A., Theunissen, J.W., Hassold, T.J., Hunt, P.A., and Petrini, J.H.J. (2007). The Mre11 Complex Influences DNA Repair, Synapsis, and Crossing Over in Murine Meiosis. *Curr Biol* 17, 373–378.
- Chikashige, Y., Tsutsumi, C., Yamane, M., Okamasa, K., Haraguchi, T., and Hiraoka, Y. (2006). Meiotic Proteins Bqt1 and Bqt2 Tether Telomeres to Form the Bouquet Arrangement of Chromosomes. *Cell* 125, 59–69.
- Cipak, L., Zhang, C., Kovacikova, I., Rumpf, C., Miadokova, E., Shokat, K.M., and Gregan, J. (2011). Generation of a set of conditional analog-sensitive alleles of essential protein kinases in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Cycle* 10, 3527–3532.
- Clift, D., and Marston, A.L. (2011). The Role of Shugoshin in Meiotic Chromosome Segregation. *Cytogenet Genome Res* 133, 234–242.
- Clyne, R.K., Katis, V.L., Jessop, L., Benjamin, K.R., Herskowitz, I., Lichten, M., and Nasmyth, K. (2003). Polo-like kinase Cdc5 promotes chiasmata formation and cosegregation of sister centromeres at meiosis I. *Nat Cell Biol* 5, 480–485.

- Connolly, T., and Beach, D. (1994). Interaction between the Cig1 and Cig2 B-type cyclins in the fission yeast cell cycle. *Mol Cell Biol* 14, 768–776.
- Connolly, T., Caligiuri, M., and Beach, D. (1997). The Cdc2 protein kinase controls Cdc10/Sct1 complex formation. *Mol. Biol. Cell* 8, 1105–1115.
- Cortez, D., Wang, Y., Qin, J., and Elledge, S.J. (1999). Requirement of ATM-Dependent Phosphorylation of Brca1 in the DNA Damage Response to Double-Strand Breaks. *Science* 286, 1162–1166.
- Coudreuse, D., and Nurse, P. (2010). Driving the cell cycle with a minimal CDK control network. *Nature* 468, 1074–1079.
- Cromie, G.A., and Leach, D.R.F. (2000). Control of Crossing Over. *Molecular Cell* 6, 815–826.
- Cromie, G., and Smith, G.R. (2008). Meiotic Recombination in *Schizosaccharomyces pombe*: A Paradigm for Genetic and Molecular Analysis. *Genome Dyn Stab* 3, 195.
- Cromie, G.A., Hyppa, R.W., Taylor, A.F., Zakharyevich, K., Hunter, N., and Smith, G.R. (2006). Single Holliday Junctions Are Intermediates of Meiotic Recombination. *Cell* 127, 1167–1178.
- Cromie, G.A., Hyppa, R.W., Cam, H.P., Farah, J.A., Grewal, S.I.S., and Smith, G.R. (2007). A Discrete Class of Intergenic DNA Dictates Meiotic DNA Break Hotspots in Fission Yeast. *PLoS Genet* 3.
- Cromie, G.A., Hyppa, R.W., and Smith, G.R. (2008). The Fission Yeast BLM Homolog Rqh1 Promotes Meiotic Recombination. *Genetics* 179, 1157–1167.
- Cummins, J.E., and Mitchison, J.M. (1967). Adenine uptake and pool formation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim. Biophys. Acta* 136, 108–120.
- Daga, R.R., Bolaños, P., and Moreno, S. (2003). Regulated mRNA Stability of the Cdk Inhibitor Rum1 Links Nutrient Status to Cell Cycle Progression. *Current Biology* 13, 2015–2024.
- Davis, L., and Smith, G.R. (2006). The meiotic bouquet promotes homolog interactions and restricts ectopic recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 174, 167–177.
- Davis, L., Rozalén, A.E., Moreno, S., Smith, G.R., and Martín-Castellanos, C. (2008). Rec25 and Rec27, novel components of meiotic linear elements, link cohesin to DNA breakage and recombination in fission yeast. *Curr Biol* 18, 849–854.
- Daya-Makin, M., Szankasi, P., Tang, L., MacRae, D., and Pelech, S.L. (1992). Regulation of p105wee1 and p34cdc2 during meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Cell Biol.* 70, 1088–1096.
- Decottignies, A., Zarzov, P., and Nurse, P. (2001). In vivo localisation of fission yeast cyclin-dependent kinase cdc2p and cyclin B cdc13p during mitosis and meiosis. *J. Cell. Sci.* 114, 2627–2640.
- Dehé, P.-M., Coulon, S., Scaglione, S., Shanahan, P., Takedachi, A., Wohlschlegel, J.A., Yates, J.R., Llorente, B., Russell, P., and Gaillard, P.-H.L. (2013). Regulation of Mus81-Eme1 Holliday junction resolvase in response to DNA damage. *Nat Struct Mol Biol* 20, 598–603.
- Ding, D.-Q., Sakurai, N., Katou, Y., Itoh, T., Shirahige, K., Haraguchi, T., and Hiraoka, Y. (2006). Meiotic cohesins modulate chromosome compaction during meiotic prophase in fission yeast. *J Cell Biol* 174, 499–508.
- Ding, D.-Q., Matsuda, A., Okamasa, K., Nagahama, Y., Haraguchi, T., and Hiraoka, Y. (2016). Meiotic cohesin-based chromosome structure is essential for homologous chromosome pairing in *Schizosaccharomyces pombe*. *Chromosoma* 125, 205–214.

- Dischinger, S., Krapp, A., Xie, L., Paulson, J.R., and Simanis, V. (2008). Chemical genetic analysis of the regulatory role of Cdc2p in the *S. pombe* septation initiation network. *J. Cell. Sci.* *121*, 843–853.
- Egan, E.D., Braun, C.R., Gygi, S.P., and Moazed, D. (2014). Post-transcriptional regulation of meiotic genes by a nuclear RNA silencing complex. *RNA* *20*, 867–881.
- Ehmsen, K.T., and Heyer, W.-D. (2008). *Saccharomyces cerevisiae* Mus81-Mms4 is a catalytic, DNA structure-selective endonuclease. *Nucleic Acids Res* *36*, 2182–2195.
- Estreicher, A., Lorenz, A., and Loidl, J. (2012). Mug20, a novel protein associated with linear elements in fission yeast meiosis. *Curr Genet* *58*, 119–127.
- Farah, J.A., Cromie, G.A., and Smith, G.R. (2009). Ctp1 and Exonuclease 1, alternative nucleases regulated by the MRN complex, are required for efficient meiotic recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 9356–9361.
- Ferretti, L.P., Lafranchi, L., and Sartori, A.A. (2013). Controlling DNA-end resection: a new task for CDKs. *Front. Genet* *4*, 99.
- Fisher, D.L., and Nurse, P. (1996). A single fission yeast mitotic cyclin B p34cdc2 kinase promotes both S-phase and mitosis in the absence of G1 cyclins. *EMBO J* *15*, 850–860.
- Forsburg, S.L., and Hodson, J.A. (2000). Mitotic replication initiation proteins are not required for pre-meiotic S phase. *Nat. Genet.* *25*, 263–268.
- Forsburg, S.L., and Nurse, P. (1994). Analysis of the *Schizosaccharomyces pombe* cyclin *pucl1*: evidence for a role in cell cycle exit. *J Cell Sci* *107*, 601–613.
- Fowler, K.R., Gutiérrez-Velasco, S., Martín-Castellanos, C., and Smith, G.R. (2013). Protein Determinants of Meiotic DNA Break Hotspots. *Mol Cell* *49*, 983–996.
- Fowler, K.R., Sasaki, M., Milman, N., Keeney, S., and Smith, G.R. (2014). Evolutionarily diverse determinants of meiotic DNA break and recombination landscapes across the genome. *Genome Res.* *24*, 1650–1664.
- Gallo-Fernández, M., Saugar, I., Ortiz-Bazán, M.Á., Vázquez, M.V., and Tercero, J.A. (2012). Cell cycle-dependent regulation of the nuclease activity of Mus81-Eme1/Mms4. *Nucleic Acids Res.* *40*, 8325–8335.
- Gómez-Escoda, B., and Wu, P.-Y.J. (2017). Roles of CDK and DDK in Genome Duplication and Maintenance: Meiotic Singularities. *Genes (Basel)* *8*.
- Goodyer, W., Kaitna, S., Couteau, F., Ward, J.D., Boulton, S.J., and Zetka, M. (2008). HTP-3 Links DSB Formation with Homolog Pairing and Crossing Over during *C. elegans* Meiosis. *Developmental Cell* *14*, 263–274.
- Grallert, A., Chan, K.Y., Alonso-Núñez, M.-L., Madrid, M., Biswas, A., Alvarez-Tabarés, I., Connolly, Y., Tanaka, K., Robertson, A., Ortiz, J.-M., et al. (2013). Removal of centrosomal PP1 by NIMA kinase unlocks the MPF feedback loop to promote mitotic commitment in *S. pombe*. *Curr. Biol.* *23*, 213–222.
- Gregan, J., Rabitsch, P.K., Sakem, B., Csutak, O., Latypov, V., Lehmann, E., Kohli, J., and Nasmyth, K. (2005). Novel Genes Required for Meiotic Chromosome Segregation Are Identified by a High-Throughput Knockout Screen in Fission Yeast. *Current Biology* *15*, 1663–1669.
- Guerra-Moreno, A., Alves-Rodrigues, I., Hidalgo, E., and Ayté, J. (2012). Chemical genetic induction of meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Cycle* *11*, 1621–1625.
- Gutiérrez-Escribano, P., and Nurse, P. (2015). A single cyclin–CDK complex is sufficient for both mitotic and meiotic progression in fission yeast. *Nat Commun* *6*.

- Hagan, I.M., and Grallert, A. (2013). Spatial control of mitotic commitment in fission yeast. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 1766–1771.
- Harigaya, Y., Tanaka, H., Yamanaka, S., Tanaka, K., Watanabe, Y., Tsutsumi, C., Chikashige, Y., Hiraoka, Y., Yamashita, A., and Yamamoto, M. (2006). Selective elimination of messenger RNA prevents an incidence of untimely meiosis. *Nature* 442, 45–50.
- Hartsuiker, E., Mizuno, K., Molnar, M., Kohli, J., Ohta, K., and Carr, A.M. (2009). Ctp1CtIP and Rad32Mre11 Nuclease Activity Are Required for Rec12Spo11 Removal, but Rec12Spo11 Removal Is Dispensable for Other MRN-Dependent Meiotic Functions. *Mol Cell Biol* 29, 1671–1681.
- Hassold, T., Hall, H., and Hunt, P. (2007). The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum. Mol. Genet.* 16, R203–R208.
- Hayashi, A., Asakawa, H., Haraguchi, T., and Hiraoka, Y. (2006). Reconstruction of the Kinetochore during Meiosis in Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 17, 5173–5184.
- van Heeckeren, W.J., Dorris, D.R., and Struhl, K. (1998). The Mating-Type Proteins of Fission Yeast Induce Meiosis by Directly Activating *mei3* Transcription. *Mol Cell Biol* 18, 7317–7326.
- Henderson, K.A., Kee, K., Maleki, S., Santini, P., and Keeney, S. (2006). Cyclin-dependent kinase directly regulates initiation of meiotic recombination. *Cell* 125, 1321–1332.
- Higuchi, T., Watanabe, Y., and Yamamoto, M. (2002). Protein Kinase A Regulates Sexual Development and Gluconeogenesis through Phosphorylation of the Zn Finger Transcriptional Activator Rst2p in Fission Yeast. *Mol Cell Biol* 22, 1–11.
- Hochwagen, A., Wrobel, G., Cartron, M., Demougin, P., Niederhauser-Wiederkehr, C., Boselli, M.G., Primig, M., and Amon, A. (2005). Novel Response to Microtubule Perturbation in Meiosis. *Mol Cell Biol* 25, 4767–4781.
- Hoffman, C.S., Wood, V., and Fantes, P.A. (2015). An Ancient Yeast for Young Geneticists: A Primer on the *Schizosaccharomyces pombe* Model System. *Genetics* 201, 403–423.
- Hyppa, R.W., and Smith, G.R. (2009). Using *Schizosaccharomyces pombe* Meiosis To Analyze DNA Recombination Intermediates. *Methods Mol Biol* 557, 235–252.
- Iino, Y., and Yamamoto, M. (1985). Negative control for the initiation of meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 2447–2451.
- Iino, Y., Hiramane, Y., and Yamamoto, M. (1995). The Role of Cdc2 and Other Genes in Meiosis in *Schizosaccharomyces Pombe*. *Genetics* 140, 1235–1245.
- Ishiguro, T., Tanaka, K., Sakuno, T., and Watanabe, Y. (2010). Shugoshin–PP2A counteracts casein-kinase-1-dependent cleavage of Rec8 by separase. *Nat Cell Biol* 12, 500–506.
- Izawa, D., Goto, M., Yamashita, A., Yamano, H., and Yamamoto, M. (2005). Fission yeast Mes1p ensures the onset of meiosis II by blocking degradation of cyclin Cdc13p. *Nature* 434, 529–533.
- Jin, Y., Uzawa, S., and Cande, W.Z. (2002). Fission yeast mutants affecting telomere clustering and meiosis-specific spindle pole body integrity. *Genetics* 160, 861–876.
- Kan, F., Davidson, M.K., and Wahls, W.P. (2011). Meiotic recombination protein Rec12: functional conservation, crossover homeostasis and early crossover/non-crossover decision. *Nucleic Acids Res* 39, 1460–1472.
- Kanoh, J., Watanabe, Y., Ohsugi, M., Iino, Y., and Yamamoto, M. (1996). *Schizosaccharomyces pombe gad7+* encodes a phosphoprotein with a bZIP domain, which is required for proper G1 arrest and gene expression under nitrogen starvation. *Genes to Cells* 1, 391–408.

- Kee, K., Protacio, R.U., Arora, C., and Keeney, S. (2004). Spatial organization and dynamics of the association of Rec102 and Rec104 with meiotic chromosomes. *EMBO J* 23, 1815–1824.
- Keeney, S. (2008). Spo11 and the Formation of DNA Double-Strand Breaks in Meiosis. *Genome Dyn Stab* 2, 81–123.
- Keeney, S., Lange, J., and Mohibullah, N. (2014). Self-Organization of Meiotic Recombination Initiation: General Principles and Molecular Pathways. *Annu Rev Genet* 48, 187–214.
- Kettenbach, A.N., Deng, L., Wu, Y., Baldissard, S., Adamo, M.E., Gerber, S.A., and Moseley, J.B. (2015). Quantitative Phosphoproteomics Reveals Pathways for Coordination of Cell Growth and Division by the Conserved Fission Yeast Kinase Pom1. *Mol Cell Proteomics* 14, 1275–1287.
- Kim, S.-T., Lim, D.-S., Canman, C.E., and Kastan, M.B. (1999). Substrate Specificities and Identification of Putative Substrates of ATM Kinase Family Members. *J. Biol. Chem.* 274, 37538–37543.
- Kitajima, T.S., Sakuno, T., Ishiguro, K., Iemura, S., Natsume, T., Kawashima, S.A., and Watanabe, Y. (2006). Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature* 441, 46–52.
- Kitamura, K., Katayama, S., Dhut, S., Sato, M., Watanabe, Y., Yamamoto, M., and Toda, T. (2001). Phosphorylation of Mei2 and Ste11 by Pat1 Kinase Inhibits Sexual Differentiation via Ubiquitin Proteolysis and 14-3-3 Protein in Fission Yeast. *Developmental Cell* 1, 389–399.
- Kjærulff, S., Lautrup-Larsen, I., Truelsén, S., Pedersen, M., and Nielsen, O. (2005). Constitutive Activation of the Fission Yeast Pheromone-Responsive Pathway Induces Ectopic Meiosis and Reveals Ste11 as a Mitogen-Activated Protein Kinase Target. *Mol Cell Biol* 25, 2045–2059.
- Kjærulff, S., Andersen, N.R., Borup, M.T., and Nielsen, O. (2007). Cdk phosphorylation of the Ste11 transcription factor constrains differentiation-specific transcription to G1. *Genes Dev* 21, 347–359.
- Kleckner, N. (2006). Chiasma formation: chromatin/axis interplay and the role(s) of the synaptonemal complex. *Chromosoma* 115, 175.
- Kobayashi, H., Stewart, E., Poon, R., Adamczewski, J.P., Gannon, J., and Hunt, T. (1992). Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. *Mol Biol Cell* 3, 1279–1294.
- Koch, A., Krug, K., Pengelley, S., Macek, B., and Hauf, S. (2011). Mitotic substrates of the kinase aurora with roles in chromatin regulation identified through quantitative phosphoproteomics of fission yeast. *Sci Signal* 4, rs6.
- Kumar, R., Bourbon, H.-M., and de Massy, B. (2010). Functional conservation of Mei4 for meiotic DNA double-strand break formation from yeasts to mice. *Genes Dev* 24, 1266–1280.
- Kunitomo, H., Higuchi, T., Iino, Y., and Yamamoto, M. (2000). A Zinc-Finger Protein, Rst2p, Regulates Transcription of the Fission Yeast *ste11+* Gene, Which Encodes a Pivotal Transcription Factor for Sexual Development. *Mol Biol Cell* 11, 3205–3217.
- Lake, C.M., Nielsen, R.J., and Hawley, R.S. (2011). The *Drosophila* Zinc Finger Protein Trade Embargo Is Required for Double Strand Break Formation in Meiosis. *PLoS Genet* 7.
- Lam, I., and Keeney, S. (2014). Mechanism and regulation of meiotic recombination initiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a016634.
- Lamb, N.E., Yu, K., Shaffer, J., Feingold, E., and Sherman, S.L. (2005). Association between Maternal Age and Meiotic Recombination for Trisomy 21. *Am J Hum Genet* 76, 91–99.
- Le, A.-H., Mastro, T.L., and Forsburg, S.L. (2013). The C-terminus of *S. pombe* DDK subunit Dfp1 is required for meiosis-specific transcription and cohesin cleavage. *Biol Open* 2, 728–738.

- Lees, E.M., and Harlow, E. (1993). Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase. *Mol Cell Biol* 13, 1194–1201.
- Li, P., and McLeod, M. (1996). Molecular Mimicry in Development: Identification of *stell1+* As a Substrate and *mei3+* As a Pseudosubstrate Inhibitor of *ran1+* Kinase. *Cell* 87, 869–880.
- Longhese, M.P., Guerini, I., Baldo, V., and Clerici, M. (2008). Surveillance mechanisms monitoring chromosome breaks during mitosis and meiosis. *DNA Repair* 7, 545–557.
- Lorenz, A., Wells, J.L., Pryce, D.W., Novatchkova, M., Eisenhaber, F., McFarlane, R.J., and Loidl, J. (2004). *S. pombe* meiotic linear elements contain proteins related to synaptonemal complex components. *J Cell Sci* 117, 3343–3351.
- Lorenz, A., Estreicher, A., Kohli, J., and Loidl, J. (2006). Meiotic recombination proteins localize to linear elements in *Schizosaccharomyces pombe*. *Chromosoma* 115, 330–340.
- Lorenz, A., Mehats, A., Osman, F., and Whitby, M.C. (2014). Rad51/Dmc1 paralogs and mediators oppose DNA helicases to limit hybrid DNA formation and promote crossovers during meiotic recombination. *Nucleic Acids Res* 42, 13723–13735.
- Ma, L., Milman, N., Nambiar, M., and Smith, G.R. (2015). Two separable functions of Ctp1 in the early steps of meiotic DNA double-strand break repair. *Nucleic Acids Res* 43, 7349–7359.
- Ma, L., Fowler, K.R., Martín-Castellanos, C., and Smith, G.R. (2017). Functional organization of protein determinants of meiotic DNA break hotspots. *Sci Rep* 7.
- Malapeira, J., Moldón, A., Hidalgo, E., Smith, G.R., Nurse, P., and Ayté, J. (2005). A Meiosis-Specific Cyclin Regulated by Splicing Is Required for Proper Progression through Meiosis. *Mol Cell Biol* 25, 6330–6337.
- Maleki, S., Neale, M.J., Arora, C., Henderson, K.A., and Keeney, S. (2007). Interactions between Mei4, Rec114, and other proteins required for meiotic DNA double-strand break formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chromosoma* 116, 471–486.
- Marston, A.L., and Amon, A. (2004). Meiosis: cell-cycle controls shuffle and deal. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 983–997.
- Martin-Castellanos, C., Labib, K., and Moreno, S. (1996). B-type cyclins regulate G1 progression in fission yeast in opposition to the p25^{rum1} cdk inhibitor. *EMBO J* 15, 839–849.
- Martín-Castellanos, C., Blanco, M.A., de Prada, J.M., and Moreno, S. (2000). The *puc1* Cyclin Regulates the G1 Phase of the Fission Yeast Cell Cycle in Response to Cell Size. *Mol Biol Cell* 11, 543–554.
- Martín-Castellanos, C., Blanco, M., Rozalén, A.E., Pérez-Hidalgo, L., García, A.I., Conde, F., Mata, J., Ellermeier, C., Davis, L., San-Segundo, P., et al. (2005). A Large-Scale Screen in *S. pombe* Identifies Seven Novel Genes Required for Critical Meiotic Events. *Current Biology* 15, 2056–2062.
- Martini, E., Diaz, R.L., Hunter, N., and Keeney, S. (2006). Crossover homeostasis in yeast meiosis. *Cell* 126, 285–295.
- Mata, J., Lyne, R., Burns, G., and Bähler, J. (2002). The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nat Genet* 32, 143–147.
- Mata, J., Wilbrey, A., and Bähler, J. (2007). Transcriptional regulatory network for sexual differentiation in fission yeast. *Genome Biol* 8, R217.
- McLeod, M., and Beach, D. (1986). Homology between the *ran1+* gene of fission yeast and protein kinases. *EMBO J* 5, 3665–3671.

- McLeod, M., and Beach, D. (1988). A specific inhibitor of the ran1+ protein kinase regulates entry into meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 332, 509–514.
- McPheeters, D.S., Cremona, N., Sunder, S., Chen, H.-M., Averbeck, N., Leatherwood, J., and Wise, J.A. (2009). A Complex Gene Regulatory Mechanism that Operates at the Nexus of Multiple RNA Processing Decisions. *Nat Struct Mol Biol* 16, 255–264.
- Melo, J., and Toczyski, D. (2002). A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Current Opinion in Cell Biology* 14, 237–245.
- Meneely, P.M., McGovern, O.L., Heinis, F.I., and Yanowitz, J.L. (2012). Crossover Distribution and Frequency Are Regulated by him-5 in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 190, 1251–1266.
- Miyoshi, T., Ito, M., Kugou, K., Yamada, S., Furuichi, M., Oda, A., Yamada, T., Hirota, K., Masai, H., and Ohta, K. (2012). A Central Coupler for Recombination Initiation Linking Chromosome Architecture to S Phase Checkpoint. *Molecular Cell* 47, 722–733.
- Moldón, A., Malapeira, J., Gabrielli, N., Gogol, M., Gómez-Escoda, B., Ivanova, T., Seidel, C., and Ayté, J. (2008). Promoter-driven splicing regulation in fission yeast. *Nature* 455, 997–1000.
- Molnar, M., Bahler, J., Sipiczki, M., and Kohli, J. (1995). The Rec8 Gene of *Schizosaccharomyces Pombe* Is Involved in Linear Element Formation, Chromosome Pairing and Sister-Chromatid Cohesion during Meiosis. *Genetics* 141, 61–73.
- Molnar, M., Doll, E., Yamamoto, A., Hiraoka, Y., and Kohli, J. (2003). Linear element formation and their role in meiotic sister chromatid cohesion and chromosome pairing. *Journal of Cell Science* 116, 1719–1731.
- Mondesert, O., McGowan, C.H., and Russell, P. (1996). Cig2, a B-type cyclin, promotes the onset of S in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 16, 1527–1533.
- Moreno, S., Hayles, J., and Nurse, P. (1989). Regulation of p34cdc2 protein kinase during mitosis. *Cell* 58, 361–372.
- Moreno, S., Klar, A., and Nurse, P. (1991). [56] Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. In *Methods in Enzymology*, G.R.F. Christine Guthrie, ed. (Academic Press), pp. 795–823.
- Morgan, D.O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131–134.
- Moser, B.A., and Russell, P. (2000). Cell cycle regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Current Opinion in Microbiology* 3, 631–636.
- Murakami, H., and Keeney, S. (2008). Regulating the formation of DNA double-strand breaks in meiosis. *Genes Dev* 22, 286–292.
- Murakami, H., and Keeney, S. (2014a). Temporospatial Coordination of Meiotic DNA Replication and Recombination via DDK Recruitment to Replisomes. *Cell* 158, 861–873.
- Murakami, H., and Keeney, S. (2014b). DDK links replication and recombination in meiosis. *Cell Cycle* 13, 3621–3622.
- Murakami, H., and Nurse, P. (1999). Meiotic DNA replication checkpoint control in fission yeast. *Genes Dev* 13, 2581–2593.
- Murakami, H., and Nurse, P. (2001). Regulation of premeiotic S phase and recombination-related double-strand DNA breaks during meiosis in fission yeast. *Nat. Genet.* 28, 290–293.
- Myers, S., Freeman, C., Auton, A., Donnelly, P., and McVean, G. (2008). A common sequence motif associated with recombination hot spots and genome instability in humans. *Nat Genet* 40, 1124–1129.

- Norbury, C., and Moreno, S. (1997). Cloning cell cycle regulatory genes by transcomplementation in yeast. In *Methods in Enzymology*, W.G. Dunphy, ed. (Academic Press), pp. 44–59.
- Obara-Ishihara, T., and Okayama, H. (1994). A B-type cyclin negatively regulates conjugation via interacting with cell cycle “start” genes in fission yeast. *EMBO J* 13, 1863–1872.
- Ogino, K., and Masai, H. (2006). Rad3-Cds1 Mediates Coupling of Initiation of Meiotic Recombination with DNA Replication Mei4-DEPENDENT TRANSCRIPTION AS A POTENTIAL TARGET OF MEIOTIC CHECKPOINT. *J. Biol. Chem.* 281, 1338–1344.
- O’Neill, T., Dwyer, A.J., Ziv, Y., Chan, D.W., Lees-Miller, S.P., Abraham, R.H., Lai, J.H., Hill, D., Shiloh, Y., Cantley, L.C., et al. (2000). Utilization of oriented peptide libraries to identify substrate motifs selected by ATM. *J. Biol. Chem.* 275, 22719–22727.
- Osman, F., Dixon, J., Doe, C.L., and Whitby, M.C. (2003). Generating crossovers by resolution of nicked Holliday junctions: a role for Mus81-Eme1 in meiosis. *Mol. Cell* 12, 761–774.
- Otsubo, Y., and Yamamoto, M. (2008). TOR Signaling in Fission Yeast. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 43, 277–283.
- Page, S.L., Nielsen, R.J., Teeter, K., Lake, C.M., Ong, S., Wright, K.R., Dean, K.L., Agne, D., Gilliland, W.D., and Hawley, R.S. (2007). A germline clone screen for meiotic mutants in *Drosophila melanogaster*. *Fly (Austin)* 1, 172–181.
- Pan, J., Sasaki, M., Kniewel, R., Murakami, H., Blitzblau, H.G., Tischfield, S.E., Zhu, X., Neale, M.J., Jasin, M., Socci, N.D., et al. (2011). A hierarchical combination of factors shapes the genome-wide topography of yeast meiotic recombination initiation. *Cell* 144, 719–731.
- Pankratz, D.G., and Forsburg, S.L. (2005). Meiotic S-phase damage activates recombination without checkpoint arrest. *Mol. Biol. Cell* 16, 1651–1660.
- Papadopoulou, K., Ng, S.S., Ohkura, H., Geymonat, M., Sedgwick, S.G., and McInerney, C.J. (2008). Regulation of gene expression during M-G1-phase in fission yeast through Plo1p and forkhead transcription factors. *J. Cell. Sci.* 121, 38–47.
- Pérez-Hidalgo, L., Moreno, S., and San-Segundo, P.A. (2003). Regulation of meiotic progression by the meiosis-specific checkpoint kinase Mek1 in fission yeast. *J Cell Sci* 116, 259–271.
- Pérez-Hidalgo, L., Moreno, S., and San-Segundo, P.A. (2008a). The fission yeast meiotic checkpoint kinase Mek1 regulates nuclear localization of Cdc25 by phosphorylation. *Cell Cycle* 7, 3720–3730.
- Pérez-Hidalgo, L., Rozalén, A.E., Martín-Castellanos, C., and Moreno, S. (2008b). Slk1 is a meiosis-specific Sid2-related kinase that coordinates meiotic nuclear division with growth of the forespore membrane. *J Cell Sci* 121, 1383–1392.
- Petronczki, M., Siomos, M.F., and Nasmyth, K. (2003). Un ménage à quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112, 423–440.
- Phadnis, N., Hyppa, R.W., and Smith, G.R. (2011). New and old ways to control meiotic recombination. *Trends Genet* 27, 411–421.
- Phadnis, N., Cipak, L., Polakova, S., Hyppa, R.W., Cipakova, I., Anrather, D., Karvaiova, L., Mechtler, K., Smith, G.R., and Gregan, J. (2015). Casein Kinase 1 and Phosphorylation of Cohesin Subunit Rec11 (SA3) Promote Meiotic Recombination through Linear Element Formation. *PLoS Genet* 11.
- Pines, J. (1996). Cell cycle: Reaching for a role for the Cks proteins. *Current Biology* 6, 1399–1402.
- Polakova, S., Molnarova, L., Hyppa, R.W., Benko, Z., Misova, I., Schleiffer, A., Smith, G.R., and Gregan, J. (2016). Dbl2 Regulates Rad51 and DNA Joint Molecule Metabolism to Ensure Proper Meiotic Chromosome Segregation. *PLoS Genet* 12.

- Pourquie, J. (1970). Antagonism by adenine in the nutrition of *Schizosaccharomyces pombe* mutants. Inhibition at the level of guanine uptake. *Biochim. Biophys. Acta* 209, 269–277.
- Reddy, K.C., and Villeneuve, A.M. (2004). *C. elegans* HIM-17 Links Chromatin Modification and Competence for Initiation of Meiotic Recombination. *Cell* 118, 439–452.
- Riedel, C.G., Katis, V.L., Katou, Y., Mori, S., Itoh, T., Helmhart, W., Gálová, M., Petronczki, M., Gregan, J., Cetin, B., et al. (2006). Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I. *Nature* 441, 53–61.
- Robert, T., Nore, A., Brun, C., Maffre, C., Crimi, B., Guichard, V., Bourbon, H.-M., and Massy, B. de (2016). The TopoVIB-Like protein family is required for meiotic DNA double-strand break formation. *Science* 351, 943–949.
- Rosu, S., Zawadzki, K.A., Stamper, E.L., Libuda, D.E., Reese, A.L., Dernburg, A.F., and Villeneuve, A.M. (2013). The *C. elegans* DSB-2 Protein Reveals a Regulatory Network that Controls Competence for Meiotic DSB Formation and Promotes Crossover Assurance. *PLoS Genet* 9.
- Rumpf, C., Cipak, L., Dudas, A., Benko, Z., Pozgajova, M., Riedel, C.G., Ammerer, G., Mechtler, K., and Gregan, J. (2010). Casein kinase 1 is required for efficient removal of Rec8 during meiosis I. *Cell Cycle* 9, 2657–2662.
- Sakuno, T., and Watanabe, Y. (2015). Phosphorylation of Cohesin Rec11/SA3 by Casein Kinase 1 Promotes Homologous Recombination by Assembling the Meiotic Chromosome Axis. *Developmental Cell* 32, 220–230.
- Sasanuma, H., Hirota, K., Fukuda, T., Kakusho, N., Kugou, K., Kawasaki, Y., Shibata, T., Masai, H., and Ohta, K. (2008). Cdc7-dependent phosphorylation of Mer2 facilitates initiation of yeast meiotic recombination. *Genes Dev* 22, 398–410.
- Sato, M., Watanabe, Y., Akiyoshi, Y., and Yamamoto, M. (2002). 14-3-3 protein interferes with the binding of RNA to the phosphorylated form of fission yeast meiotic regulator Mei2p. *Curr. Biol.* 12, 141–145.
- Scherthan, H. (2001). A bouquet makes ends meet. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 621–627.
- Scherthan, H., Wang, H., Adelfalk, C., White, E.J., Cowan, C., Cande, W.Z., and Kaback, D.B. (2007). Chromosome mobility during meiotic prophase in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* 104, 16934–16939.
- Schwacha, A., and Kleckner, N. (1995). Identification of double Holliday junctions as intermediates in meiotic recombination. *Cell* 83, 783–791.
- Shimada, M., Nabeshima, K., Tougan, T., and Nojima, H. (2002). The meiotic recombination checkpoint is regulated by checkpoint rad+ genes in fission yeast. *EMBO J* 21, 2807–2818.
- Shiozaki, K., and Russell, P. (1996). Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes Dev.* 10, 2276–2288.
- Sipiczki, M., and Ferenczy, L. (1977). Protoplast fusion of *Schizosaccharomyces pombe* Auxotrophic mutants of identical mating-type. *Mol. Gen. Genet.* 151, 77–81.
- Smagulova, F., Gregoret, I.V., Brick, K., Khil, P., Camerini-Otero, R.D., and Petukhova, G.V. (2011). Genome-Wide Analysis Reveals Novel Molecular Features of Mouse Recombination Hotspots. *Nature* 472, 375–378.
- Smith, G.R., Boddy, M.N., Shanahan, P., and Russell, P. (2003). Fission yeast Mus81/Eme1 Holliday junction resolvase is required for meiotic crossing over but not for gene conversion. *Genetics* 165, 2289–2293.

- Stamper, E.L., Rodenbusch, S.E., Rosu, S., Ahringer, J., Villeneuve, A.M., and Dernburg, A.F. (2013). Identification of DSB-1, a Protein Required for Initiation of Meiotic Recombination in *Caenorhabditis elegans*, Illuminates a Crossover Assurance Checkpoint. *PLoS Genet* 9.
- St-André, O., Lemieux, C., Perreault, A., Lackner, D.H., Bähler, J., and Bachand, F. (2010). Negative Regulation of Meiotic Gene Expression by the Nuclear Poly(a)-binding Protein in Fission Yeast. *J Biol Chem* 285, 27859–27868.
- Steiner, S., Kohli, J., and Ludin, K. (2010). Functional interactions among members of the meiotic initiation complex in fission yeast. *Curr Genet* 56, 237–249.
- Sugimoto, A., Iino, Y., Maeda, T., Watanabe, Y., and Yamamoto, M. (1991). *Schizosaccharomyces pombe* *stel1+* encodes a transcription factor with an HMG motif that is a critical regulator of sexual development. *Genes Dev.* 5, 1990–1999.
- Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J., and Stahl, F.W. (1983). The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 33, 25–35.
- Takeda, T., Toda, T., Kominami, K., Kohnosu, A., Yanagida, M., and Jones, N. (1995). *Schizosaccharomyces pombe* *atf1+* encodes a transcription factor required for sexual development and entry into stationary phase. *EMBO J* 14, 6193–6208.
- Tang, X., Jin, Y., and Cande, W.Z. (2006). Bqt2p is essential for initiating telomere clustering upon pheromone sensing in fission yeast. *J Cell Biol* 173, 845–851.
- Tischfield, S.E., and Keeney, S. (2012). Scale matters. *Cell Cycle* 11, 1496–1503.
- Traven, A., and Heierhorst, J. (2005). SQ/TQ cluster domains: concentrated ATM/ATR kinase phosphorylation site regions in DNA-damage-response proteins. *Bioessays* 27, 397–407.
- Valbuena, N., and Moreno, S. (2012). AMPK phosphorylation by Ssp1 is required for proper sexual differentiation in fission yeast. *J. Cell. Sci.* 125, 2655–2664.
- Vrielynck, N., Chambon, A., Vezon, D., Pereira, L., Chelysheva, L., Muylt, A.D., Mézard, C., Mayer, C., and Grelon, M. (2016). A DNA topoisomerase VI-like complex initiates meiotic recombination. *Science* 351, 939–943.
- Wan, L., Niu, H., Futcher, B., Zhang, C., Shokat, K.M., Boulton, S.J., and Hollingsworth, N.M. (2008). Cdc28–Clb5 (CDK-S) and Cdc7–Dbf4 (DDK) collaborate to initiate meiotic recombination in yeast. *Genes Dev* 22, 386–397.
- Wang, J., Fan, H.C., Behr, B., and Quake, S.R. (2012). Genome-Wide Single-Cell Analysis of Recombination Activity and de novo Mutation Rates in Human Sperm. *Cell* 150, 402–412.
- Watanabe, Y., Shinozaki-Yabana, S., Chikashige, Y., Hiraoka, Y., and Yamamoto, M. (1997). Phosphorylation of RNA-binding protein controls cell cycle switch from mitotic to meiotic in fission yeast. *Nature* 386, 187–190.
- Weisman, R. (2016). Target of Rapamycin (TOR) Regulates Growth in Response to Nutritional Signals. *Microbiol Spectr* 4.
- Weisman, R (2010). Fission yeast TOR and rapamycin. In *The Enzymes. Structure, function and regulation of TOR complexes from yeast to mammals Part A*. Elsevier, London 27, 251–269.
- Wilhelm, B.T., Marguerat, S., Watt, S., Schubert, F., Wood, V., Goodhead, I., Penkett, C.J., Rogers, J., and Bähler, J. (2008). Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. *Nature* 453, 1239–1243.
- Willer, M., Hoffmann, L., Styrkársdóttir, U., Egel, R., Davey, J., and Nielsen, O. (1995). Two-step activation of meiosis by the *mat1* locus in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 15, 4964–4970.

- Wood, V., Harris, M.A., McDowall, M.D., Rutherford, K., Vaughan, B.W., Staines, D.M., Aslett, M., Lock, A., Bähler, J., Kersey, P.J., et al. (2012). PomBase: a comprehensive online resource for fission yeast. *Nucleic Acids Res.* *40*, D695-699.
- Wu, P.-Y.J., and Nurse, P. (2014). Replication Origin Selection Regulates the Distribution of Meiotic Recombination. *Mol Cell* *53*, 655–662.
- Yamada, S., Ohta, K., and Yamada, T. (2013). Acetylated Histone H3K9 is associated with meiotic recombination hotspots, and plays a role in recombination redundantly with other factors including the H3K4 methylase Set1 in fission yeast. *Nucleic Acids Res* *41*, 3504–3517.
- YAMAMOTO, M. (2010). The selective elimination of messenger RNA underlies the mitosis–meiosis switch in fission yeast. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* *86*, 788–797.
- Yamamoto, A., and Hiraoka, Y. (2001). How do meiotic chromosomes meet their homologous partners?: lessons from fission yeast. *Bioessays* *23*, 526–533.
- Yamashita, A., Shichino, Y., Tanaka, H., Hiriart, E., Touat-Todeschini, L., Vavasseur, A., Ding, D.-Q., Hiraoka, Y., Verdel, A., and Yamamoto, M. (2012). Hexanucleotide motifs mediate recruitment of the RNA elimination machinery to silent meiotic genes. *Open Biol* *2*.
- Young, J.A., Schreckhise, R.W., Steiner, W.W., and Smith, G.R. (2002). Meiotic Recombination Remote from Prominent DNA Break Sites in *S. pombe*. *Molecular Cell* *9*, 253–263.
- Zickler, D., and Kleckner, N. (1999). MEIOTIC CHROMOSOMES: Integrating Structure and Function. *Annual Review of Genetics* *33*, 603–754.
- Zofall, M., Yamanaka, S., Reyes-Turcu, F.E., Zhang, K., Rubin, C., and Grewal, S.I.S. (2012). RNA Elimination Machinery Targeting Meiotic mRNAs Promotes Facultative Heterochromatin Formation. *Science* *335*, 96–100.